

Yayılmacı *Haemophilus influenzae* Hastalıklarının Mekanizması

The Mechanism of Invasive *Haemophilus influenzae* Diseases

Fatma BUDAK¹

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

ÖZET

Haemophilus influenzae'da farklı kökenlerin bir çoğunun yüzeyi polisakkarid kapsülle kaplanmıştır. *H. influenzae* antijenik yapısına göre a'dan f'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. *H. influenzae*'nin tip b serotipi, beş yaş altı çocuklarda pnömoni, menenjit, bakteremi ve epiglottit gibi yaşamı tehdit eden yayılmacı enfeksiyonlardan sorumludur. Yaşla birlikte plazmada antipolisakkarid kapsül antikorlarının düzeyinde artış, popülasyondaki yayılmacı Hib hastalığının insidansındaki azalmayla paraleldir. Ancak, 1990'lı yıllardan sonra tip b polisakkarid protein konjugat aşısının uygulanmaya başlamasıyla (Hib), kapsülsüz olanlar (NTHi) toplumda gelişen pnömoni, orta kulak enfeksiyonu, akut sinüzit, kronik bronşit alevlenmeleri gibi yayılmacı enfeksiyonlara neden olmaktadır. NTHi'ye karşı yeni aşı geliştirilmesi, yayılmacı hastalıklara karşı popülasyonu korumak için potansiyel bir çözüm olarak düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: *Haemophilus influenzae*, Hemofilus enfeksiyonları

SUMMARY

The Mechanism of Invasive *Haemophilus influenzae* Diseases

Fatma BUDAK¹

¹ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Kocaeli, Kocaeli, Turkey

The surfaces of most *Haemophilus influenzae* strains are covered with a polysaccharide capsule. They are divided into six groups, from a to f. *H. influenzae* type b serotype is responsible for invasive infections that threaten life, such as pneumonia, meningitis, bacteremia, and epiglottitis, in children below five years of age. An increase in the level of anti-rapid plasma reagin (RPR) antibodies in plasma with age is seen, in line with a population decline in the incidence of invasive Hib disease since the 1990's type b polysaccharide protein conjugate vaccine (Hib), while nontypeable *H. influenzae* (NTHi) is associated with invasive infections such as otitis media, acute sinusitis, exacerbation of chronic bronchitis, and community-acquired pneumonia. The development of new vaccines against NTHi can be considered as a potential solution to protect against the population invasive diseases.

Key Words: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* infections

Hemofilus cinsi bakteriler *Pasteurellaceae* ailesinde bulunan geniş hastalık spektrumundan sorumlu 0.2-0.3 x 1.0-2.0 µm boyutlarında gram-negatif pleomorfik ve fakültatif anaerob çomaklardır. Doğal hayvan konağı yoktur, yalnızca insanda hastalık yapar. İzolasyon için hemin (X faktörü) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD; vitamin V faktörü) içeren zenginleştirilmiş besiyerine ihtiyaç duyar. Her ikisi de kanla zenginleştirilmiş besiyerinde bulunsun bile, V faktörünün inhibitörlerini yok etmek için hafifçe ısıtılmalıdır. Bunun için laboratuvar çalışmalarında at kanlı çikolatası agar kullanılır^[1,2].

YAPISI

Hemofilusun hücre duvar yapısı, diğer gram-negatif çomaklarınkinden daha tipiktir. Endotoksin aktiviteli olan lipopolisakkarid hücre duvarında, kökene ve türe özgü proteinler dış membranda bulunmaktadır. Bu kökene özgü proteinlerin analizi, epidemiyolojik araştırmalar için değerlidir. Hem kapsüllü hem de kapsülsüz suşlarda bulunan fimbriyal ağız ve üst solunum yolu epiteline ve insan adenoid epiteline tutunmada rol oynamakta olup, kolonizasyonu da sağlamaktadır. Diğer bir virülans faktörü, *Haemophilus influenzae*'nin ürettiği IgA proteaz insan IgA1'i parçalayarak musin içinde bakterilerin tutunmasını önler. *H. influenzae*'da farklı kökenlerin bir çoğunun yüzeyi polisakkarid kapsülle kaplanmıştır. Bu antijenik yapısına göre kökenler a'dan f'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. Tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) denilen kökenler kapsül içermeyenler olarak sınıflandırılmışlardır. Bunlar hem solunum sistemi florasında bulunur hem de solunum yolu yayımlacı patojendir^[3].

EPİDEMİYOLOJİ

Kreşlerde aşısız 0-3 yaş arasındaki çocuklarda üst solunum yollarında %3-5 oranında, okul öncesi çocuklarda %8-12 oranında tip b taşıyıcılığı tanımlanmıştır^[4]. Kreşlerde okul öncesi çocuklarda ve okul çağı çocuklarda farenks taşıyıcılığı infeksiyon kaynağı olarak görev görür.

Çocukların pek çoğu yaşamın ilk ayından itibaren kapsülsüz kökenlerle kolonize olmaya başlar^[5]. Kapsülsüz kökenlerin yayımlacı *H. influenzae* hastalığı, serotip b ile oluşana göre daha yaygın görülmeye başlamıştır. Özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı

(KOAH) olanlar sıklıkla kapsülsüz *H. influenzae* türleriyle inatçı bir şekilde kolonize olurlar^[6].

Kapsüllü *H. influenzae* (serotip b) aşılınmamış çocuklarda yaygın bir hastalık nedenidir. Bu mikroorganizmalar lokal olarak yayılabilir ve kulakta (otitis media), sinüslerde (sinüzit) ve alt solunum yollarında (bronşit, pnömoni) hastalıklara neden olur^[7]. Bunun yanı sıra, *H. influenzae*'nin tip b serotipi, beş yaş altı çocuklarda pnömoni, menenjit, bakteremi ve epiglottit gibi yaşamı tehdit eden yayımlacı infeksiyonlardan sorumludur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yayımlacı Hib hastalıklarının insidans oranı Hib aşılmasının başlamasından önce her 100.000 çocukta 300 olguydu ve oran Alaska'da daha fazlaydı^[8]. İngiltere'de Oxford bölgesinde beş yaş altı çocuklarda Hib hastalığının insidansı yıllık her 100.000 olguda 35.5, 10 yaş altında ise 17 idi. Çocukların tersine 18 yaş üstü erişkinlerde yıllık yayımlacı Hib hastalığı insidansı sadece her 100.000 olguda 0.85 idi ve bunların çoğu kronik akciğer hastalığı, insan immünyetmezlik virüsü ve diğer immün direnç düşüklüğü olan olgulardı^[9].

1990'lı yıllardan sonra tip b polisakkarid protein konjugat aşısının uygulanmaya başlamasıyla (Hib), kapsülsüz olanlar (NTHi) yetişkinlerde toplumda gelişen pnömoni, orta kulak infeksiyonu, akut sinüzit, kronik bronşit alevlenmeleri gibi yayımlacı infeksiyonlara neden olmaktadır^[10]. Çocuklarda ise kapsülsüz olanlar bir çalışmada %6, diğerinde %7 oranında yayımlacı hastalıklardan sorumludur^[11]. Farley'in çalışmasında; erişkinlerde NTHi yayımlacı hastalıklarının insidansı 100.000'de 0.81 iken, yenidoğanlar hariç 10 yaş altı çocuklarda 100.000'de 0.5 idi^[9].

KAPSÜLLÜ *H. INFLUENZAE*'LARDA PATOGENEZ ve İMMÜNİTE

Taşıyıcılık oranı yayımlacı hastalıkların insidansından daha fazla olduğundan bu infeksiyona karşı doğal savunma mekanizmaları var olmalıdır. Pili ve pilus olmayan adezinler, *H. influenzae*'nin orofarenkse kolonizasyonunu sağlar. Bakterinin hücre duvar komponentleri siliyer fonksiyonları bozar. Bakteriler hem epitele hem endotele ve kana geçebilir.

Lipopolisakkarid lipid A komponenti hayvan modelinde meningeal inflamasyonu indüklemiştir. İmmünglobulin A1 proteazlar *H. influenzae* (kapsüllü

ve kapsülsüz kökenler) tarafından üretilir ve hümmoral immüniteyle etkileşime girerek mukoza yüzeyinde kolonizasyonu kolaylaştırabilir.

Kapsüllü olanlardan tip b majör virülans faktörü riboz, ribitol fosfat (poliribozil ribitol fosfat) içeren antifagositik polisakkarid kapsüldür. Aşılama yapılmadan önceki dönemlerde, Hib'e karşı koruyucu bağışıklık gelişmesi mikroorganizmaya maruz kalmayla oluşur. Yenidoğanlar ve küçük çocuklar anneden transplasental geçen IgG antikoruyla korunur. Maternal IgG'nin azalması altı ay civarında oluşur ve bu dönemde bebekler yayılcı Hib hastalığına duyarlı olur. Hib'in nazofarenkste taşınması genellikle iki aydan sonra başlar ve mikroorganizmaya doğal bağışıklık gelişene kadar sürer. Hib'e karşı doğal antikorlar, PRP ile çapraz reaksiyon yapan antijenleri taşıyan *Escherichia coli* K100 gibi bakterilere maruz kalmayla artar^[12]. İnvaziv Hib hastalığına karşı ileri yaş çocukların ve erişkinlerin bağışıklığı bakteri opsonizasyonunda yüksek derecede etkili olan polisakkarid kapsül (PRP)'e karşı doğal kazanılmış antikorlarla ilişkilidir. Yaşla birlikte plazmada anti-PRP antikorlarının düzeyinde artış, popülasyondaki yayılcı Hib hastalığının insidansındaki azalmayla paraleldir. Böylece aşılammış çocuklarda koruyucu anti-PRP antikorlarının toplamı çapraz reaktif antijenlerle bağışıklanma kadar Hib taşıyıcılığından sonuçlanan doğal bağışıklanmaya da neden olur. Çocuklarda anti-PRP antikorlarının plazma düzeyinin karakteristik yaşa bağlı paterni bakteriyel polisakkarid antijene tuhaf immün yanıtlara neden olur. Polisakkarid antikorlarına karşı antikorların üretiminden sorumlu olan B hücrelerin olgunlaşması iki yaştan sonradır. Genelde çocuklar beş yaş civarında PRP'ye karşı bir miktar koruyucu bağışık yanıtı tamamlar^[12]. Yayılcı Hib hastalığının insidansı anti-PRP antikor düzeyleriyle ilişkili olduğundan, beş yaş üzeri çocuklarda neden hastalığın nadir görüldüğü açıklanabilir.

Kapsüllü bakterilerin kapsüler polisakkaridleri, T hücrelerin yardımı olmaksızın B hücrelerin yüzeyindeki immünglobulinleri çapraz bağlayarak uyararak, T bağımsız tip 2 (TI-2) antijen ailesine aittir. Kapsüler polisakkaridler, tekrarlayan epitopluları taşıyan antijenlerdir. Böylece, B hücre aktivasyonun başlangıcından sonra tek B hücrelerinin yüzeyinde çoklu antijen reseptörle çapraz bağlanma kapasitesindedir. TI-2 antijen ailesi iki yaş altı çocuklarda

zayıf immünojen veya immünojen olmamasıyla karakteristiktir. Her yaşta immünolojik hafızayı ve antikor afinite matürasyonunu uyarması yetersizdir. Proteinlerin tersine kapsüler polisakkaridler MHC sınıf II molekülle ilişkili antijen sunumuna da ihtiyaç duymaz^[14].

TI-2 yanıtının bir sonucu saf kapsüler polisakkarid aşılardan, erişkinlerin tersine hastalığın en çok görüldüğü yaş olan erken çocuklukta yetersiz olduğudur. Protein antijenleriyle aşılama küçük çocuklarda oldukça başarılıdır. Çünkü T helper fonksiyonu bebekte erken gelişir. TI-2 antijenlerinin iki yaşa kadar neden immünojenik olmadığı tam anlaşılamamıştır. Önerilen neden, primer olarak antipolisakkarid antikor IgG2'nin, en büyük izotipi kadar polisakkarid yanıtına karşı sorumlu olan B hücrelerin, dalak marginal zondaki popülasyonunun gelişmesini geciktirmesidir^[13]. Ek olarak aksesuar hücrelerden bazı birlikte uyarılar ve kapsüler polisakkaridlere yanıt için esas olan kompleman sistem insanda oldukça geç gelişir^[14]. Sonuç olarak bebekler Hib kapsüler polisakkarid aşısına zayıf yanıt verir. Aslında saflaştırılmış PRP polisakkarid aşısı, IgM antikorun prevalansı ile üretimin kısa süresiyle karakterize olan genç çocuklarda olgun olmayan bağışık yanıtı uyarır^[15]. Buna rağmen PRP'nin bağışıklanması yoluyla uyarılmış Hib'e karşı kapsül polisakkarid antikorunun biyolojik özellikleri, hem doğal hem de infeksiyonla uyarılmış antikorlarla benzerdir. Hib invaziv hastalıklarına karşı antipolisakkarid antikor yanıtları ve PRP ile bağışıklama, yaşa bağımlı ilişkili benzerliklerin işaretini göstermiştir. Yayılcı Hib hastalığından iyileşmiş olan çocuklar, yayılcı Hib geçirmeyen çocuklarla kıyaslandığında polisakkarid aşısına düşük yanıtı sahiptir. Bu mikroorganizmanın polisakkarid antijenleriyle ardışık aşılama, küçük çocukların immün yanıtlarını baskılayabilir^[16].

TİPLENDİRİLEMİYEN H. INFLUENZAE'LARDA PATOGENEZ ve İMMÜNİTE

Hib konjuge aşılardan, Hib taşıyıcılığını ve endüstrileşmiş ülkelerin çocukları arasındaki hastalığı elimine etmiştir. Fakat tiplendirilemeyen türlerden dolayı hastalıklar eskisine göre daha sıktır. Tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) hem çocuklarda hem de erişkinde ölümcül infeksiyonlara neden olur. Erişkinde en önemli olay KOAH'lı kişilerde solunum yolu hastalıkları

larıdır. Bu klinik durum hava yolunda bakterinin kronik kolonizasyonuna ve hastalığın akut alevlenmesine yol açar. Bundan başka NTHi sağlıklı çocuklarda orta kulak infeksiyonu, sinüzit, konjunktivit ve pnömoniye neden olur. Bakteremi, menenjit gibi yayılmacı infeksiyonlar yenidoğan ve immün direnci tam konaklarda nadirdir. NTHi yüzeyinde çoklu adezyon moleküllü salgılar ve bu adezinler insan solunum yolunda bulunan çeşitli hücre tiplerinde, konak reseptörü olarak bireysel özellikler gösterir^[17].

P2 proteini, NTHi'nin en büyük dış membran proteindir ve dış membran proteinin yarısını oluşturur. P2 insan serum bakterisidal antikorun bir hedefidir. P6 ise NTHi suşlarının dış membranında var olan peptidoglikan ilişkili lipoproteindir ve suşlar arasında yüksek derecede sekans korunmuşluğu gösterir. P6 etkisiyle TNF ve IL-8 salınımı ve makrofaj inflamasyon olaylarıyla bakterisidal yanıt oluşur^[18].

NTHi lipooligosakkaridi (LOS) en büyük virülans faktörüdür ve solunum yolunda mukozal yüzeyinin invazyonu ve kolonizasyonunda rol oynayabilir^[19]. NTHi LOS'u gram-negatif enterik bakterilerin lipopolisakkaridlerine eş değerdir. LPS, 3-deoksi D manno oktuloseonik asit tarafından heterojen şeker polimerlerine bağlanan lipid A içerir^[20]. NTHi LOS'u tekrarlayan O antijen üniteleri içermediğinden klasik enterik LPS'den farklı olan, *Neisseria* ve *Bordetella* türlerinininkine daha çok benzer.

Diğer bakteriyel infeksiyonların birçoğu gibi NTHi infeksiyonları da sitokinler ve kemokinlerin salınımıyla yangıyı başlatır. İn vitro çalışmalarda; NTHi, NF-κB yolunu solunum yolunda epitelyum hücrelerinde uyarır ve IL-6, IL-8, TNF içeren yangı öncesi mediyatörlerin yapısını ve salınımını önemli bir şekilde artırır^[21]. Solunum yolu epitel hücreleri, akciğer inflamasyonu ile sonuçlanan doğal bağışıklık mekanizmalarından inflamatuvar uyarana yanıt verir^[22]. Bu mekanizmaların çoğu Toll-like reseptörlerin (TLR) fonksiyonudur. Bunlar paten tanıma reseptörü olarak hizmet eden, korunmuş transmembran reseptör ailesidir ve konağa bakterilerin giriş bölgelerinde bulunan fagositler, dendritik ve epitelyal hücrelerde üretilir. Bakteri LPS, peptidoglikan, flagellin, metillenmeyen CpG DNA (DNA'nın metillenmeyen sitozin guanin üniteleri) ve tek ve çift sarmal RNA moleküllerinde korunmuş mikrobiyal mo-

tifleri tanır. LPS reseptör kompleksinin, ligand bağlayan parçası olarak görev gören CD14 ile bağlanmasında; TLR-4, gram-negatif hücre duvarının en büyük proinflamatuvar parçası olan LPS'yi tanıma da görevlidir^[23].

TLR-4'ün tetiklenmesi, iki farklı hücre içi yolağının uyarılmasıyla sonuçlanır. Bunlardan birisi, yaygın TLR'ye uygun MyD88, diğeri IFN-β'yı uyararak adaptör içeren Toll/IL-1R domaini ile ilişkilidir. Wieland ve arkadaşları CD14 ve TLR-4 knock out farelerin alveoler makrofajlarının, in vitro NTHi'ye yanıtız olduklarını göstermiştir^[24]. Farede NTHi'nin intranazal olarak verilmesi sonucu akciğerdeki nötrofillerde IL-1β, IL-6, TNF, MIP-1α, MIP-2, BALF aktivasyonu görülür. CD14 ve TLR-4 knock out farelerde, NTHi'nin intranazal uygulamasından sonra, IL-1β, IL-6, TNF, MIP-1α, MIP-2, BALF azaltılmış aktivasyonu akciğerlerde zayıflatılmış erken inflamatuvar yanıt göstermiştir.

TLR-2 de akciğer patojenlerine karşı inflamatuvar yanıt ile ilişkili olarak kritik rol oynar^[25]. NTHi insan epitelyum hücresindeki NF-κB'yi iki sinyal yolağı ile güçlü şekilde aktive eder. Bunlar NF-κB translokasyona bağımlı ve bağımsız yolaklardır^[21]. NF-κB translokasyona bağımlı yolak, IκBα fosforilasyonuna ve degradasyonuna önderlik eden, NF-κB indükleyen kinaz kompleksin (NIK)-KKα/β aktivasyonunu içerir. Tersine NF-κB translokasyon bağımsız yolak MKK3/6 MAPK'nın aktivasyonunu içerir. TLR-2, NTHi ile indüklenen NF-κB'nin her iki yolak ile aktivasyonu için gereklidir ve OMP P6'da benzer sinyal yolaklarıyla NF-κB'yi aktive eder^[21]. NTHi; in vitro akciğer epitelyum hücrelerinde ve in vivo akciğer dokusundaki TLR-2 sayesinde NF-κB ve p38 MAPK bağımlı durumda COX-2 ve PGE2 ekspresyonunu da uyarır^[26].

NTHi makrofajların, musin PAF reseptör, CEACAM1, ICAM1 ve diğerlerindeki reseptörler çoklu hücre tiplerine spesifik yapışma gösterir^[27,28]. NTHi klasik ekstraselüler patojen olarak düşünülmesine rağmen, epitel hücreleri makrofaj gibi solunum yolundaki hücrelerin ve interstisyum içinde ve ek olarak musin ve yüzey epiteline yapışarak bulunmaktadırlar^[29]. İnsan solunum yolunun NTHi ile infeksiyonu, konak inflamatuvar yanıtı uyararak ve musin üretimini düzenleyen birçok sinyal yolağını düzenler^[29].

NTHi suşları patojenik potansiyellerde farklılık gösterir. Orta kulak infeksiyonlarına neden olma kapasitesindeki suşların nazofarenkste kolonize olan ve semptomatik kolonizasyona neden olan suşlarla karşılaştırıldığında genlerinin farklı olduğu gözlenir. NTHi'nin solunum yoluna kolonizasyonu için doğal savunma mekanizmaları, diğer bakterilerle yarışma yeteneği önemlidir^[30].

NTHi'nin biyofilmleri, orta kulak hayvan modellerinde ve orta kulak infeksiyonlu çocukların kulaklarında gösterilmiştir^[31]. Planktonik bakterilerle karşılaştırılırsa, biyofilmlerdeki bakteriler, konak temizleme mekanizmalarına ve antibiyotiklere daha dirençlidir^[32]. Bazı yazarların, otitis medianın patogeneğinde biyofilmlerin rolünü açıklaması özellikle *H. influenzae* tarafından oluşan tekrarlayan hastalıklarda tedaviye ve hastalığın önlenmesine yeni yaklaşımların geliştirilmesi açısından önemlidir.

TIPLENDİRİLEMİYEN *H. INFLUENZAE* İÇİN AŞI ÇALIŞMALARI

Son yıllarda insanda ciddi infeksiyona yol açan NTHi bakterisi ile ilişkili olarak patogeneze çalışmalarını dikkati çekmiştir^[33]. Hib (*H. influenzae* tip b) aşısı pnömokok aşısı gibi kapsül temellidir. NTHi ise *Moraxella catarrhalis* gibi kapsülsüzdür. Burada yaklaşım, suşlar arasında korunan yüzey proteinlerini bulmaktır^[34]. İdeal bir aşı antijeni; bakteri yüzeyinde olmalı, suşlar arasında korunmalı örneğin suşdan suşa benzer sekans olmalı, insan üst solunum yolunda olduğunda eksprese olmalı ve korunmuş bağışık yanıtı uyarmalıdır.

Prymula, *H. influenzae*'nin protein D'sine konjuge olan pnömokokal kapsüler polisakkaridli 11 valanlı aşının etkinliğini test etmiştir^[35]. Lipoprotein D, nazofarengeal hücrelerin siliyer fonksiyonunu bozan, hayvan modelinde orta kulak infeksiyonuna neden olma kapasitesini artıran ve monositlerde *H. influenzae*'nin girişini ve yapışmasını artıran *H. influenzae* yüzey proteininde korunmuştur^[36]. Bu randomize, çift-kör, prospektif, plasebo kontrollü denemede pnömokokal aşı serotipleri nedeniyle oluşan orta kulak infeksiyonu için etkinlik %57.6, *H. influenzae* orta kulak infeksiyonu için etkinlik %35 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar aşı geliştirilmesinin uygulanabilirliği için umut vermektedir.

Orta kulak infeksiyonuna eğilimli çocuklar NTHi açısından özellikle faydalanacaktır. Kimin orta kulak infeksiyonuna yatkınlığı olacağını tahmin etmek zordur, bu yüzden orta kulak infeksiyonu için evrensel aşılamanın gerekli olacağı olasıdır.

SONUÇ

NTHi patogeneğinde yer aldığı düşünülen bakteriyel özgün ve konağa özgün süreçler tanımlanmıştır. NTHi suşları genetik ve fenotipik olarak farklıdır. NTHi suşlarının mukozal veya sistemik infeksiyonlara neden olması için kapasitelerini değiştirip değiştirmediği veya konak faktörlerinin primer olarak yeni bir NTHi suşunun kazanımının sonucundan sorumlu olup olmadığı açık değildir. Sekanslanan genomun elde edilebilmesi NTHi'nin çalışmalarını kolaylaştırır^[33].

İleri çalışmalarla; sağlıklı taşıyıcılarda var olan türlerin dinamiklerini ve genetik dağılımlarını anlamak için yayılcı *H. influenzae* hastalıklarının keşfedilmesi, bilgimize yeni bir boyut katacaktır.

KAYNAKLAR

1. Murphy TF. *Haemophilus infections*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone, 2005:2661-9.
2. Budak F, Gür D. Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının çeşitli antimikrobik ilaçlara in-vitro duyarlılığı. *Mikrobiyol Bul* 2003;37:19-25.
3. Long SS, Henretig FM, Teter MJ, McGowan KL. Nasopharyngeal flora and acute otitis media. *Infect Immun* 1983; 41:987-91.
4. Peerbooms PG, Engelen MN, Stokman DA, van Benthem BH, van Weert ML, Bruisten SM, et al. Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2832-6.
5. Faden H, Waz MJ, Bernstein JM, Brodsky L, Stanievich J, Oqhra PL. Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:612-5.
6. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press, 2007.
7. Sethi S, Muscarell K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000;118:1557-65.

8. Ward JL, Lum MK, Hall DB. Invasive *H. influenzae* type b disease in Alaska: background epidemiology for a vaccine efficacy trial. *J Infect Dis* 1986;108:887-96.
9. Farley MM, Stephans DS, Brachman PS, Harvey C, David Smith J, Wenger JD. CDC meningitidis Surveillance Group. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults. *Ann Intern Med* 1992;116:806-12.
10. Rao VK, Krasan GP, Hendrixon DR, Dawid S, St. Geme JW. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typeable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* 1999;23:99-129.
11. Mason EO, Kaplan SL, Laambertm LB, Hinds DB, Kverland SJ, Loisella EM, et al. Serotype and ampicillin susceptibility of *Haemophilus influenzae* causing systemic infections in children: 3 years of experience. *J Clin Microbiol* 1982;15:543-6.
12. Insel RA, Anderson PW Jr. Cross-reactivity with *Escherichia coli* K100 in the human serum anticapsular antibody response to *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* 1982;128:1267-70.
13. Robbins JB, Parke JC Jr, Schneerson R, Whisnant JK. Quantitative measurement of natural and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. *Pediatr Res* 1973;7:103-110.
14. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B cell activation by T cell independent type 2 antigens as an internal part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 2000;176:154-70.
15. Smith DH, Peter G, Ingram DL, Harding AL, Anderson P. Responses of children immunized with the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics* 1973;52:637-44.
16. Schneerson R, Rodrigues LP, Parke JC Jr, Robbins JB. Immunity to disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. II. Specificity and some biologic characteristics of "natural" infection-acquired, and immunization-induced antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Immunol* 1971;107:1081-9.
17. Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:631-8.
18. Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S. Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage pro-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2005;73:2728-35.
19. DeMaria TF, Apicella MA, Nichols WA, Leake ER. Evaluation of the virulence of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide htrB and rfaD mutants in the chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* 1997;65:4431-5.
20. Mandrell RE, McLaughlin R, Aba Kwai Y, Lesse A, Yamasaki R, Gibson B, et al. Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infect Immun* 1992;60:1322-8.
21. Wilson R. Evidence of bacterial infection in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Semin Respir Infect* 2000;15:208-15.
22. Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, et al. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1322-30.
23. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-80.
24. Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, et al. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J Immunol* 2005;175:6042-9.
25. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 7):S408-S15.
26. Xu F, Xu Z, Zhang R, Wu Z, Lim JH, Koqa T, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* induces COX-2 and PGE2 expression in lung epithelial cells via activation of p38 MAPK and NF-kappa B. *Respir Res* 2008;9:16.
27. Reddy MS, Bernstein JM, Murphy TF, Faden HS. Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infect Immun* 1996;64:1477-9.
28. Bookwalter JE, Jurcisek JA, Gray-Owen SD, Fernandez S, McGillivray G, Bakaletz LO. A CEACAM1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the chinchilla nasopharynx via the OMP P5-homologous adhesin. *Infect Immun* 2008;76:48-55.
29. Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, Buscher B, Bandi VK, Apicella MA. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* 1999;67:4161-70.
30. Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, et al. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* 2002;168:810-5.
31. Hong W, Mason K, Jurcisek J, Novotny L, Bakaletz LO, Swords WE. Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* 2007;75:958-65.
32. Slinger R, Chan F, Ferris W, Yeung SW, St. Denis M, Gaboury I, et al. Multiple combination antibiotic susceptibility testing of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:247-53.
33. Thanavala Y, Lugade AA. Role of nontypeable *H. influenzae* in otitis media and chronic obstructive pulmonary diseases. *Adv Otorhinolaryngol* 2011;72:170-5.

34. Murphy TF. Vaccine development for nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: progress and challenges. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:843-53.
35. Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and nontypable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet* 2006;367:740-8.
36. Forsgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clin Infect Dis* 2008;46:726-31.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Doç. Dr. Fatma BUDAK

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Kocaeli-Türkiye

E-posta: fatma.budak@isbank.net.tr