

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ATİPİK PNÖMONİ ETKENLERİNİN SAPTANMASINDA İFA  
YÖNTEMİ**

Türkan KOCABAŞ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 022. TIP. 08  
Proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2003-008

2003 - AFYON



## ÖNSÖZ

Afyon bölgesinde daha önce araştırılmamış bir patojen grubu olarak atipik pnömoni etkenlerinin varlığının şüpheli hastalarda saptanması bu tezin konusunu oluşturmaktadır. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında IFA ve ELISA yöntemleri ile hastanemiz bünyesinde takip edilen hastalarda olası etkenler araştırılmıştır. Bu tez çalışması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 022. TIP. 08 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tezin seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye, program boyunca bilimsel katkılarından dolayı hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalına, istatistik hesaplamaları sırasındaki katkılarından dolayı hocam Sayın Doç.Dr. Fatma AKTEPE'ye, çalışmanın yürütülmesi sırasındaki katkılarından dolayı Arş. Grv. Dr. Yeliz ÇETİNKOL'a, mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve özellikle aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Önsöz.....	III
İçindekiler.....	IV
Şekiller.....	V
Çizelgeler.....	VI
<b>ÖZET</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>1.GİRİŞ</b> .....	3
1.1. Bakteriyolojik Etkenler.....	3
1.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
1.1.1.1. Tarihçe.....	4
1.1.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri.....	4
1.1.1.3. Patojenite.....	5
1.1.1.4. Laboratuvar tanısı.....	5
1.1.1.5. Epidemiyoloji.....	5
1.1.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	6
1.1.2.1. Tarihçe.....	6
1.1.2.2. Mikrobiyolojik özellikler.....	6
1.1.2.3. Patojenite.....	7
1.1.2.4. Laboratuvar tanısı.....	7
1.1.2.5. Epidemiyoloji.....	8
1.1.3. <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	8
1.1.3.1. Tarihçe.....	8
1.1.3.2. Mikrobiyolojik özellikler.....	8
1.1.3.3. Patojenite.....	9
1.1.3.4. Laboratuvar tanısı.....	9
1.1.3.5. Epidemiyoloji.....	10
1.2. Atipik Etkenler.....	10
1.2.1. <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	10
1.2.1.1. Tarihçe.....	10
1.2.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri.....	11
1.2.1.3. Patojenite.....	12
1.2.1.4. Laboratuvar tanısı.....	13
1.2.1.5. Klinik belirtiler.....	15

1.2.1.6. Epidemiyoloji.....	15
1.2.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	16
1.2.2.1. Tarihçe.....	16
1.2.2.2. Mikrobiyolojik özellikleri.....	16
1.2.2.3. Patojenite.....	17
1.2.2.4. Laboratuvar tanısı.....	18
1.2.2.5. Klinik belirtiler.....	19
1.2.2.6. Epidemiyoloji.....	20
1.2.3. <i>Legionella pneumophila</i> .....	20
1.2.3.1. Tarihçe.....	21
1.2.3.2. Mikrobiyolojik özellikleri.....	21
1.2.3.3. Patojenite.....	21
1.2.3.4. Laboratuvar tanısı.....	23
1.2.3.5. Klinik belirtiler.....	26
1.2.3.6. Epidemiyoloji.....	27
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
1.3.1. Mikrobiyolojik özellikleri.....	28
1.3.2. Patojenite.....	29
1.3.3. Laboratuvar tanısı.....	30
1.3.4. Epidemiyoloji.....	
1.4. Viral pnömoniler.....	30
1.4.1. Influenza ve parainfluenza virusları.....	31
1.4.2. Respiratuvar sinsityal virus.....	31
1.4.3. Adenoviruslar.....	32
1.4.4. Viral etkenlerin laboratuvar tanısı.....	32
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>48</b>
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>54</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>56</b>

**ŞEKİLLER**

Şekil 1: Biyoçip slayt yöntemi test prosedürü akış diyagramı.....	34
Şekil 2: <i>M. pneumoniae</i> ELISA test prosedürü akış diyagramı.....	36
Şekil 3: <i>C. pneumoniae</i> IgM ve IgA MIF test prosedürü akış diyagramı.....	38
Şekil 4 : <i>L. pneumophila</i> IFA test prosedürü akış diyagramı.....	39
Şekil 5 : Değişik titrelerde <i>L. pneumophila</i> pozitiflik sayıları .....	43
Şekil 6 : Virusların aylara göre pozitiflik sayıları.....	44
Şekil 7 : Virusların yaşlara göre pozitiflik sayıları.....	44
Şekil 8 : <i>M. pneumoniae</i> ve, <i>C. pneumoniae</i> pozitifliğinin aylara göre dağılımı....	45
Şekil 9 : <i>M. pneumoniae</i> ve <i>C. pneumoniae</i> pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı....	46

## ÇİZELGELER

Tablo 1 : Sık rastlana atipik pnömonilere ait özellikler.....	19
Tablo 2: : <i>C. pneumoniae</i> ve <i>M pneumoniae</i> IgM ve IgA pozitifliklerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması.....	39
Tablo 3: <i>C. pneumoniae</i> ‘nin hasta ve kontrol gruplarındaki IgM ve IgA pozitiflik sayıları.....	40
Tablo 4 : <i>M. pneumoniae</i> ve, <i>C. pneumoniae</i> ile viral etkenlerin birlikteliği.....	42
Tablo 5: pnömoni etkenleriyle bakteriyel pnömoni etkenlerinin beraber görüldüğü olguların dökümü.....	43
Tablo 6 : <i>M. pneumoniae</i> , <i>C.pneumoniae</i> ve <i>L. pneumophila</i> ile birlikte görülen CRP yüksekliği ve lökositozlu hasta sayıları.....	47

## ÖZET

### **Atipik Pnömoni Etkenlerinin Saptanmasında IFA Yöntemi**

Pnömoni enfeksiyöz etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan bir alt solunum yolu hastalığıdır. Yaptığı klinik tablolara göre klasik ve atipik görünüm olarak değerlendirilirler. Atipik pnömoniler, balgamsız veya az miktarda mukoid balgamın eşlik ettiği, günler içinde artış gösteren öksürük, üst solunum yolları infeksiyonu yakınmaları, düşük dereceli ateş, kas ve eklem ağrılarının bulunduğu, akciğer muayenesinde grafi bulguları ile uyumsuz olarak pek az dinleme bulgusunun olduğu, laboratuvar tetkiklerinde ise lökosit sayısının normal veya hafif artışı ile seyreden hastalıklardır. Atipik pnömonilerden sorumlu başlıca etkenler; *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* gibi bakteriler ve bazı viruslardır. Bölgemizde bu patojenlerin sıklıklarının saptanmasına yönelik hiçbir veriye ulaşılamamıştır. Bu çalışma, hastanemizde klinik tanı konulan atipik pnömonili hastalarda, belirtilen ajanların saptanması amacıyla yapıldı. Çalışmaya, bir yıl boyunca hastanemize başvuran 21-83 yaşları arasındaki hastalar dahil edildi. Bu dönemde; 36'sı kadın, 42'si erkek olmak üzere toplam 78 hastaya ait örnekler incelendi. Her bir hasta için hasta bilgilerinin içeren bir form dolduruldu. Hasta serumlarında, yukarıda sayılan ajanlar açısından IgM, IgA ve total antikorlar İmmün Floresan Antikor (IFA) ve Enzimli İmmün Deneyi (ELISA) yöntemleriyle çalışıldı. Serum örneklerinin 36'sında (% 46,1) *M. pneumoniae* IgM 30'unda (% 38,4), *C. pneumoniae* IgM, birinde ise (% 1,2) *L. pneumophila* IgM antikorları tespit edildi.

Sonuç olarak, bu yüksek seropozitivite bulguları ışığında bölgemizde atipik pnömoni etkenlerinin sık olarak görüldüğü ve şüpheli hastalarda bu etkenlerin araştırılmasının tanı ve tedavi açısından gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: **Atipik Pnömoni, M.Pneumoniae, C.Pneumoniae, L.Pneumophila, IFA.**



## SUMMARY

### **The detection of causative agent of atypical pneumoniae by IFA**

Pneumoniae is a lower respiratory tract disease caused by several infectious agents. It is defined clinically in two categories, classical appearance and atypical pneumoniae. The symptoms of atypical pneumonia are; without or less amount of mucoid sputum, increasing cough in progress, accompanying upper respiratory tract infection complaints, low grade temperature, muscle and joint pains. The characteristics of disease are a discordance between physical examination of chest findings and radiography, and normal or low level leucocytosis.

The agents mainly responsible for atypical pneumoniae are bacterial pathogens such as; *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and some viruses. There is not any data about the detection of these pathogens in our region. In this study, we aim to detect the agents that mentioned above, on the patients with atypical pneumoniae which are diagnosed in our hospital. For the study we take the patients at 21-83 years olds who are admitted to our hospital were analysed during one year. Of 36 women and 42 men totally 78 patients are enrolled in our study. We take serum specimens and an inquiry from the patients. From these specimens, specific IgM, IgA and total antibodies of pathogens were studied by Immun Fluorescence Antibody (IFA) and Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). *M pneumoniae* IgM is detected serologically in 36 patients (%46,1), *C.pneumoniae* IgM in 30 patients (%38,4), *L.pneumophila* IgM in one patient (%1,2).

In conclusion, in the sight of this high seropositivity findings we believe that atypical pneumonia agents appears frequently in our region and search of these agents in suspicious patients is necessary for diagnosis and treatment.

Key Words: Atypical pneumonia, *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*, IFA.

## 1. GİRİŞ

Alt solunum yolu infeksiyonlarından pnömoniye yol açan etkenleri üç ana grupta toplayabiliriz. Bunlar;

. Klasik bakteriyel etkenler : *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, yanı sıra önemli bir etken olarak tüberkülozun (Tbc) akciğer tutulumu ;

. Atipik etkenler: *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*;

. Viruslar: Influenza virusları, Respiratuvar sinsityal virus (RSV), Parainfluenza virusları ve Adenoviruslar başlıca etkenler olarak sayılabilir.

Atipik pnömoni etkenlerinin ortaya çıkardığı klinik tablo hafif seyretmesine karşın, herhangi bir nedenle immün sistemin zayıflaması halinde ağır bir görünüm ortaya çıkabilmektedir. Bu etkenlerin klasik yöntemlerle saptanması zor olduğu için genelde serolojik testler tanı amacıyla kullanılmaktadır (1).

Bölgemizde atipik pnömoni etkenlerinin saptanmasına yönelik hiçbir veri yoktur. Bu çalışmada; atipik pnömoni belirtileri gösteren ve Kronik obstruktif akciğer hastalığı (KAOH), astma gibi rahatsızlıklarla hastanemize başvuran hastalarda atipik etkenlerin varlığı İmmün Floresan Antikor (IFA) yöntemi ve yanısıra bazı parametreler için Enzimli İmmün Deney (ELISA) yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır.

### 1.1. BAKTERİYEL ETKENLER

Başta *S. pneumoniae* olmak üzere, bakteriyel etkenli pnömonilerin çoğunda akut bakteriyel hastalığa ait tipik klinik tablo oluşmaktadır. Bu tablonun ana özellikleri; titreme ile yükselen ateşle birlikte ani başlangıç, prodüktif öksürük, yan ağrısı, fizik muayenede konsolidasyon bulguları, radyolojik olarak lobar tutulum ve genellikle lökositozdur (1).

### **1.1.1. *Streptococcus pneumoniae***

#### **1.1.1.1. Tarihçe:**

Micrococcacea familyasına ait olan *S. pneumoniae*, gram pozitif bir koktur. Mikroorganizma, Pasteur ve Sternberg tarafından ilk olarak 1881'de bulunmuş ve Frankel- Weicelbaum'un (1884-1886) çalışmaları ile, akciğerin akut bir infeksiyonu olan lobar pnömoni yaptığı ortaya çıkarılmıştır. *S. pneumoniae*'nin farklı serolojik tipleri 1910'da tanımlanmıştır (2).

#### **1.1.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri:**

Bu bakteriler 0.5- 1µm büyüklüğünde, mum alevi veya lanset biçiminde, iki uçları sivri, tek kok veya diplokok şeklindedir. Sıvı besiyerinde uzun; balgam, irin ve seröz sıvılarda kısa zincirler şeklinde görülebilir. Hareketsiz, sporsuz ve fakültatif anaerobdurlar. Organizmadan yeni ayrıldıklarında tipe özel kapsülleri vardır. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram olumludurlar. Buyyon, jeloz gibi basit besiyerlerinde zor; kan, serum ve haben gibi maddelerle zenginleştirilmiş ortamlarda kolaylıkla ürerler. Genellikle % 5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda daha iyi ürerler. Aerob koşullarla üretildiğinde pnömolizin-O etkisi ile koloni çevresinde bir β hemoliz zonu oluştururlar. Metabolizma ürünü olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yaparlar. Karbonhidrat fermantasyonu yapıp çok miktarda laktik asit oluştururlar. İnülini, asit oluşturup parçalarlar. Tanısında kullanılan önemli bir özelliği de optokin duyarlılığıdır (3,4).

Antijenik yapısında kapsül önemli bir yer tutar. Kapsül antijeni hapten özelliğinde bir polisakkarit bileşimidir. Kapsülün tiplendirmedeki rolü büyüktür. *S. pneumoniae* 'nın bilinen 85'ten fazla tipi gösterilmiştir. Hücre duvarının asıl elemanı türe özel bir karbonhidrat olan polisakkarit C antijenidir. Bu antijene karşı özgül antikor niteliğinde olmayan C reaktif proteini (CRP) oluşur. F veya Forsman antijeni, lipoteikoik asit yapısındadır, protein yapısındaki M antijenine karşı oluşan antikorlar fagositozu inhibe etmez ve koruyucu değildir (2).

### 1.1.1.3. Patojenite :

Kapsüllü bakteriler, opsonik etki ile antikorları nötralize ettiğinden fagositoza dirençli, yüksek derecede patojen ve virülandırlar. Serumlarında infeksiyonu yapan pnömokokun kapsül polisakkaridine (Poly-ribozil-fosfat, PRP) karşı antikor bulunan kimseler, o tip pnömokokun infeksiyonuna karşı dayanıklılık gösterirler. Başlıca 23 patojen tip belirlenmiş olup, bunlar aşı çalışmalarında kullanılmaktadır. Yanısıra bir hemolizin olan pnömolizin -O hücre membran harabiyeti yapan sitolitik bir toksindir, dermatoksik ve öldürücüdür. Pnömokokların oluşturduğu neurominidase enzimi hücre membranı ve vücut sıvılarında bulunan glikoprotein ve glikolipide etki ederek asetilnöraminik asidi ayırır. Bu enzim pnömokokların vücutta yayılımını artırır (5).

### 1.1.1.4. Laboratuvar tanısı :

Pnömonili olguların balgamı; kanlı, pashı ve yapışkandır. Daha sonra irinli nitelik kazanır. Gram boyamasında gram pozitif lanset şeklinde diplokoklar görülür. Kanlı agarda *S. pneumoniae* 24 saat içinde etrafı yeşil bir hemoliz zonu ile çevrilmiş küçük koloniler şeklinde ürer. Kan kültürü için 5-15 ml kan thioglycollate buyyona 1-10 oranında inoküle edilir. Buradan kanlı agar pasajları yapılır. Gerek hastalık materyalinden, gerekse kültürden fare deneyi yapılabilir. İdentifikasyonlarında; optokin duyarlılığı ve inülin fermentasyonu kullanılır. *S. pneumoniae*, tip spesifik antikorlarla kapsül şişme reaksiyonu ile tiplendirilir. Antijen aranmasında ise lateks aglütinasyon, immünoelektroforez, ELISA ve IFA tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır (4,6,7).

### 1.1.1.5. Epidemiyoloji :

*S. pneumoniae*'yı hastalar ve taşıyıcılar öksürük damlacıkları ile yayarlar. Pnömonikal pnömoni, sıklıkla üst solunum yolu virus infeksiyonlarının varlığında ve kış aylarında görülür. Sağlıklı görünen normal erişkinlerin %50-70'inin nazofarenksinde bir veya birkaç tip *S. pneumoniae* bulunmaktadır. Bu taşıyıcıların sayısı, mevsimlere bağımlı olarak, zaman zaman artışlar göstermektedir. *S. pneumoniae*'nin en patojen olarak kabul edilen 1,2 ve 3 tipinin taşıyıcılık oranları daha azdır. Bu üç serotip bakteriyemik pnömokokal hastalıkların %75'inden sorumlu tutulmaktadır (2).

## 1.1.2. *Haemophilus influenzae*

### 1.2.1.1. Tarihçe :

Pasteurellaceae familyasına ait olan *Haemophilus influenzae*, gram negatif bir kokobasildir. Mikroorganizma, ilk olarak 1889-1892 Avrupa influenza pandemisinden sonra, 1892'de R.R.J. Pfeiffer tarafından izole edilmiş, influenza nedeni olarak kabul edilmiş ve 'Influenza bacillis' şeklinde isimlendirilmiştir. 1899'da Slawk bu etkene bağlı menenjitleri açıklamış, 1920'de Amerikan Bakterioloji Cemiyeti bakterinin çoğalmak için kan faktörüne ihtiyaç duyduğunu belirtmek üzere ismini *H. influenzae* olarak değiştirmiştir. M. Pittman 1931'de kapsüllü ve kapsülsüz *H. influenzae* 'ları tanımlamış ve kapsül antijenlerine göre (a-f) serotiplerine işaret etmiştir. *H. influenzae* tip b'nin antibiyotik direnci 1974'te gösterilmiş ve Klian tarafından 1976'da biyokimyasal özelliklerine göre biyotip I-IV bulunmuştur. Bunlara biyotip V-VIII de eklenmiştir (2).

### 1.2.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri :

*H. influenzae* 0,5-2 µm uzunluğunda ve 0,3-0,5 µm genişliğinde uçları yuvarlak kokobasildir. Paralel kümeler ve kısa zincirler yapabilir. Bir kısmı lökositlerce fagosite edilmiş şekildedir. Hareketsiz, sporsuz, bipolar kutupsal boyanma gösteren, gram negatif bakterilerdir. Virulan *H. influenzae* 6-8 saatlik buyyon kültüründe ve 4-8 saatlik katı besiyerinde kapsül oluşturur. Aerop ve fakültatif anaerop bir bakteridir. *H. influenzae* kanlı agar, çikolata agar ve Levinthal'in kaynamış kanlı agarında üretilebilir. *H. influenzae*'nın besiyerinde çoğalabilmesi için protoporfirin IX (X faktörü) ve nikotinamid adenin dinükleotid (V faktörü) faktörlerine gereksinimi vardır. Kanlı agarı 80°C 'de kahverengiye dönüşüncüye kadar kaynatmak suretiyle kan hücrelerinden X ve V faktörleri serbestleşir. Safraya dayanıksızdır, jelatinde üremez, nitrat redüksiyonu yaparlar, laktoz, sükröz, mannitol fermentasyonu yapmazlar, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri negatiftir, hemaglutinasyon yapmazlar, genelde indol yapar, üreyi parçalarlar. Tiplendirmede kapsülün rolü büyüktür, a-f arasında 6 tip olarak tanımlanmıştır. Bunun dışında antiserumlarla tiplendirilemeyen patojen suşlar da bulunmaktadır. Bunların yanı sıra biyokimyasal reaksiyonlarına göre de tiplendirilmektedirler (8).

### 1.2.1.3. Patogenite :

*H. influenzae* deney hayvanları için toksiktir. Endotoksin etkisi izlenir. Ekzotoksini gösterilmemiştir. Kapsül ve dış membran proteinleri, patojenite determinantlarıdır. *H. influenzae* Ig A proteaz salgılar. Bakteri öncelikle IgA ile korunan bölgeleri infekte eder (2).

### 1.2.1.4. Laboratuvar tanısı:

Klinik tabloya göre alınan hastalık materyali; boğaz, burun, nazofarenks sürüntüsü, balgam, beyin omurilik sıvısı (BOS), eklem ve plevra sıvısı, kulak akıntısı veya kan olabilir.

Materyaller; %5 koyun kanlı agar, Levinthal kaynamış agarı ve %5 koyun kanlı çikolata agarına inoküle edilir. *H. influenzae* basilleri mavimtrak parlaklıkta ince, çiğ tanesi şeklinde koloniler halinde ürer. Gram negatif, küçük, pleomorfik kokobasiller saptanır. Oksidaz pozitif reaksiyon veren kolonilerde X ve V faktörü gereksinimi araştırılır. *H. influenzae*, *S.aureus* gibi katalaz enzimi bulunan bakterileri etrafında çoğalabilir (9).

Kapsüllü bakteriler, Neufeld testi ile tiplendirilir. Kapsül şişme reaksiyonu ile en sık b tipine rastlanmaktadır. BOS'ta spesifik *H. influenzae* polisakkarit antijenleri, zıt yönlü immünoelektroforez tekniği ile araştırılır. Lateks aglutinasyon, ELISA, IFA yöntemleri de kullanılmaktadır (10).

### 1.2.1.5. Epidemiyoloji

*H. influenzae* dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunmakta ve 5 yaşın altındaki çocuklar risk grubunu oluşturmaktadır. *H. influenzae* 2 yaş altındaki çocukların menenjit, artrit ve sellülitin birinci sıradaki nedenidir. Bakteri, solunum yolu infeksiyonlarında primer veya sekonder hastalık etkeni olabilmektedir. *H. influenzae* infeksiyonlarında en sık rastlanan suşu serotip b'dir.

Kapsülsüz *H. influenzae*'lar gençlerde % 60-90, erişkinlerde %35 oranlarında, asemptomatik olarak, nazofarenks florasında bulunur. Çocuklardan izole edilenlerin %5'i kapsüllü ve bunların yarısı da tip b *H. influenzae*'dir (11,12).

### 1.1.3. *Moraxella catarrhalis*

#### 1.1.3.1. Tarihçe:

*Moraxella*, *Neisseriaceae* familyası içerisinde yer alan, gram negatif diplokoktur. Mikroorganizma ilk olarak 1896'da Pfeiffer tarafından bronkopnömoni çocukların bronşiyal ve alveollerinden izole edilerek *Micrococcus catarrhalis* olarak isimlendirilmiştir. Nükleik asit hibridizasyon çalışmaları, guanin-sitozin miktarı ve genetik transformasyon çalışmaları sonunda farklı bir genus olarak '*Moraxella*' şeklinde tanımlanmıştır. Başlıca hastalık yapıcı türü *Moraxella catarrhalis*'tir (2). *Branhamella catarrhalis* olarak da adlandırılan bu etken, taksonomik olarak *Moraxella* genusunda bir alt genus olarak sınıflandırılmıştır (8).

#### 1.1.3.2. Mikrobiyolojik özellikleri:

*M. catarrhalis*, temelde gram negatif diplokok morfolojisinde olmakla beraber bazen gram pozitif boyanır. Bu durumda renksizleştirme işlemine tabi tutulur. Mikroskopik olarak böbrek ya da kahve çekirdeği görünümünde, diplokoklar şeklindedir. Hücreler ikiye bölünüp çoğaldıklarından, bazen tetrad görünümü verebilirler. Tek bir hücrenin büyüklüğü 0,6-1,5 µm arasında değişmektedir. Endosporları yoktur ve hareketsizdirler. Aerop ve fakültatif anaerop olup, basit besiyerinde kolaylıkla ürerler. Kültürde 3-5 mm çapında, yuvarlak, nonhemolitik, beyazımtırak-gri renkte koloniler oluştururlar. Koloniler agara yapışık değildir ve öze ile besiyerinin üzerinden bozulmadan kayarlar. *M. catarrhalis* katalaz, oksidaz olumludur. Bu mikroorganizmanın diğer katalaz ve oksidaz pozitif gram negatiflerden ayıran özellikler biyokimyasal olarak; glikoz, fruktoz, maltoz, sükroz ve laktozu fermente edememeleri, oda ısısında nutrient agarda üremeleridir. Nitrat ve nitriti redükte etmeleri, DNase ve butirat esteraz reaksiyonlarının pozitif olması ile identifikasyona gidilir (13-15).

#### 1.1.3.3. Patojenite:

*M. catarrhalis* 'in yüzey maddelerinin antijenik analizlerinde P-protein olarak isimlendirilen türe spesifik protein varlığı gösterilmiştir. 8 majör dış membran proteini (A-H) tanımlanmıştır. Dış membran proteinlerinden E ve G bakteri yüzeyinde antijenik determinant özelliğindedir. Hücre yüzey lipopolisakaritleri antijenik olarak benzer olduğundan dolayı, antijenik ayırmada faydalı olmaz ancak serolojik olarak *M. catarrhalis*'e bağlı hastalığı araştırırken kullanılabilir. *M. catarrhalis* 'te tip 4 pilusun olabileceği ve buna ek olarak farklı bir sınıfta bir pilusun da varlığı belirlenmiştir. Bu iki farklı tip pilusun, *M. catarrhalis* 'in mukozal epitel hücrelerine yapışmasında, orada kolonize olup gelişmesinde rolü olabileceği savunulmaktadır (2).

#### 1.1.3.4. Labotatuvar tanısı:

Materyal olarak; alt solunum yolu hastalığı olanlarda balgam, otitis medialı hastalarda dış kulak sekresyonu, bakteriyel pnömoni, trakeit, larenjitli hastalarda nazofarinks sürüntüsü, akut sinüzitli hastalarda maksiller sinüs sürüntüsü, menenjitli hastalarda BOS incelenir. Mikroskopik incelemede materyal gram ile boyanarak, diplokoklar aranır. Balgam ve BOS'ta hücreler aranır ve sayılır. Kültür için örnekler CO<sub>2</sub>'li ve CO<sub>2</sub>'siz %5 koyun kanlı çikolata agara, %5'lik oyun kanlı agara, Thayer-Martin, Mueller-Hinton agara ekilir. Gram negatif diplokok kolonilerinden kanlı agara subkültürler yapılabilir. Katalaz, oksidaz, glikoz, maltoz, sükröz, fruktoz ve laktoza etkileri, nitrat ve nitrit redüksiyonu ve DNase testleri yapılır (13).

#### 1.1.3.5. Epidemiyoloji:

*M.catarrhalis*, üst solunum yolunun normal flora üyesi olarak bulunabilmektedir. Patojen olarak; akut otitis media, sinüzit, bronkopulmoner infeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Solunum yolundaki kolonizasyonu, yetişkinlere göre çocuklarda daha siktir. Sık sık solunum yolu infeksiyonu geçiren, tekrarlayan otitis mediaya eğilimli çocuklarda kontrol grubuna göre kolonizasyon sıklığı daha fazladır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber, viral infeksiyonun mukozadaki hasarının *M. catarrhalis*'in kolonizasyonuna ve infeksiyona yol açtığı ileri sürülmektedir.

### 1.1.4. *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1.1.4.1. Mikrobiyolojik özellikleri:

*M.tuberculosis* 0,2-0,5 µm eninde 1-4 µm boyunda basillerdir. Tek tek, küçük zincirler veya demetler halinde bulunurlar. Kültürden hazırlanan preperatlarda kokoid veya flamantöz formlarda görülebilirler. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüzdürler. Gram ve birçok laboratuvar boyası ile boyanmazlar. Bakterinin toplam lipid miktarı hücre duvarı kuru ağırlığının %60'ı kadardır. Bu yüksek lipid miktarı bakterinin dış etkilere olan direncinde rol oynadığı gibi adi laboratuvar boyaları ile boyanmasına da mani olur. Boyanın bakteri içine penetre olabilmesi için boyama işlemi sırasında ısıtılması gerekir (8).

*M.tuberculosis* yavaş üreyen bir bakteri olup bölünme zamanı yaklaşık 20 saattir. Buna bağlı olarak gözle görülür koloni oluşturma süresi diğer bakterilere oranla daha uzundur. *M. tuberculosis* için bu süre yaklaşık 3-8 haftadır.

*Mycobacterium* hücre duvarının ana iskeletini peptidoglikan oluşturmaktadır. Bu yapıya arabinogalaktan molekülleri fosfodiester bağları ile bağlanır, ucunda da

mikolik asitler yer almaktadır. Mikolik asitler ise değişik lipid, glikolipid, ve bazı proteinler ile sonlanmaktadır (51).

#### **1.1.4.2. Patojenite:**

*M.tuberculosis* kişiden kişiye geçişi solunum yolu ile olur ve hava yolu ile geçen infeksiyonların klasik örneğidir. Hemen hemen tüm örneklerde, tüberküloz infeksiyonu, içerisinde canlı tüberküloz basili içeren ve havada asılı halde bulunan yeterince küçük damlacıkların solunum yolları ile alınması ve bunların alveollere yerleşmesi ile gerçekleşir. Bir hastanın bulaşıcı olabilmesi için, basilin havaya verilmesi ve burada aerosol hale geçmesi gerekir. O nedenle sadece akciğer ve larinks tüberkülozlu hastalar bulaştırıcı olarak kabul edilir (52).

#### **1.1.4.3. Laboratuvar tanısı:**

##### ***Uygun Örnek Alma Esasları :***

Tüberkülozun değişik organ ve sistem tutulumları ile seyredebilme özelliği nedeni ile tanıda balgam, gastrik aspirasyon sıvısı, bronkoalveolar lavaj sıvısı(BAL), akciğer dokusu, plevral sıvısı, lenf nodu, kemik iliği, karaciğer peritoneal sıvı, idrar, dışkı ve BOS gibi çeşitli klinik örnekler kullanılabilir. Örnekler steril ağız kapaklı kaplara alınmalı ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Akciğer tüberkülozu tanısında en sık kullanılan örnek balgamdır. Bu balgam 3 gün üst üste alınmalı ve sabah ilk balgam olmalıdır. Tükürük içermemesine dikkat edilmelidir.

Direkt mikroskopik inceleme özellikle akciğer tüberkülozu tanısında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Basillerin incelenmesi için belli başlı boyama yöntemlerinden faydalanılır. Bunlar; Erlich-Ziehl-Neelsen, Kinyoun ve Floresanlı Boyama yöntemleridir (53,54).

##### ***Kültür:***

*Mycobacterium* türlerine bağlı infeksiyonların mikrobiyolojik tanısında kültürün mutlak yeri vardır. Uzun süreli inkübasyon gerektirmesi en olumsuz özelliğidir. İzalasyonunda genellikle yumurtalı besiyeri olarak Lowenstein-Jensen (LJ) besiyeri ve agarlı besiyeri olarak da Middlebrook 7H11 besiyerine olmak üzere iki besiyerine ekim yapılır. Ekimlerin, bir katı bir sıvı besiyerine ekilmesi tercih edilir (55).

Kültürler, LJ besiyerine ekilerek 3-6 hafta süreyle 37<sup>0</sup> C'de inkübe edilir. Üreme olduğunda koloniler, üreme hızı, büyüklük, görünüm ve pigment oluşumu açısından değerlendirilerek biyokimyasal testler ve hızlı yöntemler ile tür tayini yapılır.



### ***Hızlı kültür yöntemi:***

Yaklaşık yirmi yıldır kullanılan BACTEC gibi radyometrik kültür yöntemleri ile *M.tuberculosis*'in klinik örneklerde varlığının gösterilmesi ortalama bir haftaya indirilmiş, ancak yöntemin pahalı oluşu ve radyoizotoplar gerektirmesi özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanımını sınırlanmıştır. Sıvı besiyeri bazlı hızlı kültür yöntemi olarak Bactec yönteminin yanında M/B BacT yöntemini de sayabiliriz (56).

### ***Hayvan Deneyi :***

Kobay, fare gibi deney hayvanlarına materyalin inokulasyonu duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Ancak çok özel koşullar gerektirmesi nedeni ile günümüzde kullanımı azalmıştır.

#### **1.1.4.4. Epidemiyoloji:**

Tüberküloz tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünyada her yıl, %95'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere 8 milyondan fazla yeni tüberküloz olgusu görülmektedir. Bu dünya üzerinde tek bir mikroorganizmanın sebep olduğu en yüksek ölüm oranıdır.

Yurdumuzda da 1990 yılı Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre olgu sayısı, yaklaşık 12 milyon kişi bu da nüfusumuzun %25'ini oluşturmaktadır ki çok büyük bir orandır (57,58).

## **1.2. ATİPİK ETKENLER**

### **1.2.1. *Chlamydia pneumoniae***

#### **1.2.1.1. Tarihçe:**

Klamidya cinsi bakteriler arasında, insana adapte olmuş bir kökenin bulunabileceği ve insanda insana solunum yoluyla bulaşabileceği iddiası, ilk kez 1943 yılında, Joseph E. Smadel, tarafından ortaya atılmıştır (16). Smadel'in bu iddiası ancak 40 yıl sonra kanıtlanabilmiştir. *C. pneumoniae* ilk kez 1965'te Taiwan'da, 1968'de İran'da iki çocuğun konjunktivasından, embriyonlu yumurtada izole edilmiştir. Bu bakterilerin morfolojik özellikleri, 1971'de hücre kültürü yöntemlerinin kullanıma girmesiyle belirlenmiş, diğer klamidya türlerinde farklı oldukları anlaşılmış ve Taiwan'da izole edilen kökene TW-138 adı verilmiştir. Ancak daha sonra, bu iki kökenin

konjuktivadan izole edilmiş olmalarına karşın, göz infeksiyonları ile ilişkili olmadıkları ve inklüzyon özelliklerinin *C. psittaci*'ye benzemediği anlaşılmıştır. Bunun üzerine, 1977'de, *C. psittaci*'ye benzeyen, fakat onun tipik özelliklerine sahip olmayan bir kökenin neden olduğu bir pnömoni epidemisine ait serumlar, 1980'li yıllarda yeniden incelenmiş ve epidemiden TW-138 kökeninin sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (17). 1983 yılında bakteri ilk kez solunum yolundan izole edilmiş ve AR-39 olarak adlandırılmıştır. Bunun üzerine bu yeni patojene TW-138 ve AR-39'un birleştirilmesiyle TWAR adı verilmiştir ve bir süre bu isim kullanılmıştır. Bakteri 1989'da yeni bir klamidya türü olarak tanımlanmış ve *C. pneumoniae* şeklinde isimlendirilmiştir (3).

### 1.2.1.2. Mikrobiyolojik özellikler:

*C. pneumoniae*, *Chlamydiales* takımının *Chlamydiaceae* ailesindeki zorunlu hücre içi paraziti olan gram negatif bir bakteridir ve benzersiz yaşam döngüsüyle öteki bakterilerden ayrılırlar.

*C. pneumoniae*, klamidya cinsinin üçüncü türü olarak yakın zamanda tanımlanmıştır ve insanlarda en sık hastalık etkeni olan klamidya türüdür. Bu bakteri, en çok solunum yolu hastalıklarına neden olur. Mikroorganizmayı, *Chlamydia trachomatis* ve *Chlamydia psittaci*'den ayıran en önemli özellikler, aralarında < % 10 DNA homolojisi olması, farklı görünümde elemanter cisimlerin bulunması, solunum yoluyla bulaşması ve hayvan rezervuarının olmamasıdır (18).

Klamidyalar metabolik enerji üretme yetenekleri olmayan, ATP sentezleyemeyen gram negatif bakteriler olarak nitelendirilebilirler. Bu nedenle de zorunlu hücre içi parazitidirler (19).

Tüm klamidyaların üreme döngüsü aynıdır. Elemanter cisimler (EC) bakterinin dış ortama dayanıklı, enfeksiyöz şekilleridir. Bunlar konak hücreyi infekte ettikten sonra retiküler cisimlere (RC) dönüşürler. İkiye bölünerek çoğalan RC'ler tekrar EC'leri oluştururlar. Sonuçta, hücrenin sitoplazmasında EC'lerden oluşan büyük bir inklüzyon cismi meydana gelir. Hücrenin parçalanmasıyla birlikte EC'ler dışarı salınır. Bakterinin üreme döngüsü 48-72 saat sürer. *C. pneumoniae*'nin EC'leri, diğer türlerden farklı olarak, armut şeklindedir ve periplazmik aralığı çok geniştir (8,18).

*C. pneumoniae*'nin hücre duvarı, diğer klamidya türlerinde olduğu gibi, gram negatif bakterilerin hücre duvarına benzemekle birlikte, peptidoglikan içermez, ancak lipid içeriği fazladır, lipopolisakkarit yapısındadır (20). Klamidyalarda penisilin bağlayan proteinlerde vardır ve hücre duvarı sentezi üzerinde etkili antimikrobiyaller, klamidyal hücre duvarı sentezini inhibe ederler.

*C. pneumoniae*, gram boyası ile zor boyanır ve gram olumsuz veya değişken özellik gösterir, ancak tanımlanmasında bu yöntem değer taşımaz. Bakterinin EC'leri Giemsa ile mor, RC'leri mavi boyanırlar. Hücre içinde oluşturduğu inklüzyon cisimleri Giemsa ile mor boyanır; ancak floresein ile işaretli monoklonal antikor ile boyama, daha özgül bir yöntem olduğundan, inklüzyonların gösterilmesi için tercih edilmektedir. Inklüzyonları glikojen içermediğinden, lügol ile boyanmaz (19).

*C. pneumoniae* kökenleri arasındaki DNA homolojisi >%94 iken, bakterinin diğer klamidya türleriyle DNA homolojisi <%10'dur. Bu bakterinin günümüze kadar saptanmış tek serovarı bulunmaktadır (18).

*C. pneumoniae* oda ısısına ve dondurarak saklanmaya *C. trachomatis*'ten daha duyarlıdır. Enfektivitelerini, 60°C'de 10 dakika içinde kaybederler. Dondurularak (-50 ile -70°C arasında) saklandıklarında uzun yıllar enfektif kalabilirler, fakat hızlı dondurma sırasında enfektivitelerinin yaklaşık %50'sini yitirirler. Eter ve fenol ile hızla inaktive olurlar (19,21).

### 1.2.1.3. Patojenite:

*C. pneumoniae*, mukoza epiteli hücrelerinin yanı sıra, monosit, makrofaj, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerini de infekte eder (22). Bu da, bakterinin, sistemik olarak yayılabileceğini düşündürmektedir. *C. pneumoniae* ile deneysel olarak yapılan hayvan çalışmaları da bu düşüncüyü desteklemektedir. *C. pneumoniae* ile intratrakeal veya intranazal olarak inoküle edilen tavşanlarda, ilk hafta içinde bronşiyolit ve pnömoni bulgularının ortaya çıktığı görülmüştür. Bu hayvanların akciğer dokularından yapılan histopatolojik incelemelerde, intertisyum, alveoler boşluk ve bronş lümeninde makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan infiltratlar saptandığı belirtilmektedir. Ayrıca alveolar makrofajlar, intertisyel hücreler ve peribronşiyoler lenfoid dokunun yanısıra, dalak, karaciğer ve aort dokusunda da *C. pneumoniae* antijenine rastlanmıştır. Benzer şekilde, fare modelinde de, akciğer dokusundan başka, dalak ve aortadan bakteri izole edilmiş ve bakterinin, 20 hafta gibi uzun bir süre boyunca bu dokularda persistans gösterdiği saptanmıştır.

Ateroskleroz etiopatogenezinde kesin rolü kanıtlanmış olan *C. pneumoniae*'nin, monosit ve makrofajlar aracılığıyla sistemik olarak dağıldıktan ve damar endoteline yerleştikten sonra hangi mekanizma ile hasar oluşturduğu tam olarak bilinmemektedir; ancak bu konuda bazı teoriler bulunmaktadır (23). Kronik koroner kalp hastalığı olan kişilerde, klamidyal lipopolisakkarit (LPS) içeren immün komplekslerin dolaşımında bulunduğu gösterilmiştir. Klamidyal LPS'nin, *C. pneumoniae* ile infekte makrofajların parçalanmasıyla salındığı ve yine makrofajlardan salınan IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerle birlikte, hem pıhtılaşma zincirini aktive etmek hem de trigliseritleri artırıp, HDL düzeylerinde düşmeye yol açmak suretiyle ateroskleroz plağı oluşumuna katkıda buldukları öne sürülmektedir.

#### 1.2.1.4. Labotatuvar tanısı:

*C. pneumoniae* infeksiyonlarının tanısı, organizmanın hücre kültüründen izolasyonu, serolojik incelemeler ve nükleik asit araştırma yöntemine dayanmaktadır.

#### *Hücre kültüründen izolasyon*

*C. pneumoniae* tüm klamidya türleri arasında, hücre kültüründen izolasyonu en zor olanıdır. İzolasyonu için en uygun örnekler, nazofaringiyal sürüntüler ve bronkoalveolar lavaj sıvısıdır. Bu amaç için önceleri HeLa 229 hücreleri ve embriyonlu yumurta kullanılmış, hücrelerin DEAE-dekstran ile işleme tabi tutulmasının, alınan örneğin 1700 x g'de santrifügasyonla hücrelere inoküle edilmesinin ve kültür ortamına sikloheksimit eklenmesinin, izolasyon şansını artırdığı belirtilmiştir (8,21).

#### *Serolojik inceleme*

*C. pneumoniae* izolasyonunun güç olması nedeniyle, infeksiyon tanısında serolojik incelemelere daha sık başvurulmaktadır. Bu amaç için en güvenilir test, mikroimmünofloresans (MIF) testidir (5). MIF, cinse özgül antijenleri içermeyen, sadece türe ve türler arasındaki serovarlara ait antijenleri kapsayan, özgül ve duyarlı bir testtir (24).

*C. pneumoniae* infeksiyonunda iki farklı antikor yanıtı görülür. Primer infeksiyonda, hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra IgM antikorları, 6-8 hafta da IgA ve IgG antikorları ortaya çıkar. Enfeksiyonu akut olarak değerlendirebilmek için IgM'in  $\geq 1:16-1:32$ , IgG'nin  $\geq 1:512$  titrede olması gerekir. Reinfeksiyonlarda ise, IgM yanıtı yoktur; infeksiyondan sonraki 1-2 hafta içinde IgG titresi  $\geq 1:512$  gibi yüksek değerlere ulaşır. Aynı zamanda sekonder IgA yanıtı da olabilir. Serum anti klamidyal IgG antikorlarının 1:16-1:512 arasında bulunması geçirilmiş infeksiyon

göstergesi olarak kabul edilirken, IgG ve IgA titrelerinin yüksek seyretmesi ( IgG  $\geq$  1:512, IgA  $\geq$  1:40) kronik infeksiyon lehine değerlendirilmektedir (8,17,26).

### ***Nükleik asit araştırma yöntemleri***

Hibridizasyon tekniği, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve son olarak ligaz zincir reaksiyonu (LCR) klamidya infeksiyonlarının tanısına duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yöntemler arasında yer almaktadır (27,28). Hibridizasyon tekniği maliyetinin pahalı olması nedeniyle rutin amaçla kullanım alanı sınırlı bir yöntemdir. Ayrıca son yıllarda radyoaktif olmayan problemlerin kullanıldığı ticari kitler hazırlanmış olup, hücre kültürü ile karşılaştırmalı yapılan bir çalışmada duyarlılığının %89-95 olduğu bildirilmiştir. PCR ve LCR muayene maddelerinde çok düşük oranda bulunan klamidya genetik materyalini enzim ve primerler yardımıyla saptanabilir hale getiren ve son yıllarda popüleritesi artan önemli yöntemler arasında bulunmaktadır. Ancak her iki testten alınabilecek başarının oranı, laboratuvar şartlarının uygun olmasına bağlıdır (25).

*C. pneumoniae* infeksiyonlarının PCR yöntemi kullanılarak tanımlanması konusunda yapılmış olan çalışmalar başarılıdır (28). Özellikle izolasyonu güç olması ve bazı hastalarda serolojik yanıtın geç ortaya çıkması veya hiç oluşmaması nedeniyle, PCR, hastalığın erken ve hızlı tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. *C. pneumoniae* infeksiyonlarının tanısında PCR'nin değerini araştırılan çalışmalarda, izolasyonun altın standart kabul edilmesine bağlı olarak, PCR'nin duyarlılığı ve özgüllüğüne ilişkin bazı tartışmalar bulunmaktaysa da, genel kanı, bu yöntemin, izolasyona göre çok daha duyarlı olduğu yönündedir.

#### **1.2.1.5. Klinik belirtiler:**

*C. pneumoniae* pnömonisi genellikle hafif seyirli olmakla birlikte, yaşlı kişilerde ve zeminde kronik hastalığı olanlarda daha ağır tablolar gösterebilir; hatta ölümlü sonuçlanabilir (29,30). Hastalık kapalı topluluklarda epidemiler şeklinde seyrederek ve genellikle endeks olguyu, 2-4 hafta içinde, çok sayıda yeni olgu izler (17). Ayrıca, ilk belirtinin başlamasından, hastaneye başvuru kadar geçen zaman, diğer pnömonilere göre daha uzundur (29,31). Bazı serilerde, hastaların tümünde veya büyük bölümünde yüksek ateş saptanırken bazı çalışmalarda da *C. pneumoniae* pnömonilerinin, özellikle de reinfeksiyonların çoğunlukla afebril oldukları belirtilmektedir (26,32). Öksürük özellikle de produktif öksürük, anormal solunum sesleri, boğaz ağrısı ve farenjit, hastalarda en sık rastlanılan belirti ve bulgular arasında sayılabilir. Bunların yanısıra, ses kısıklığı, baş ağrısı, rinit, göğüs ağrısı ve lenfadenopati, hastalığın daha az rastlanılan diğer belirti ve bulgularıdır.

#### **1.2.1.6. Epidemiyoloji:**

*C. pneumoniae* 'nin, asemptomatik infeksiyondan, bronşit ve pnömoniye kadar değişik solunum yolu hastalıklarında etken olduğu gösterilmiş (31), ateroskleroz oluşumunda ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde de rol oynadığı kanıtlanmıştır. Bugüne kadar yapılmış olan çeşitli çalışmalarda, toplumdan edinilmiş pnömonilerin % 9-15'inden, atipik pnömonilerin ise yaklaşık %8'inden *C. pneumoniae*'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Mikroorganizmanın yapmış olduğu infeksiyon *C. pneumoniae* infeksiyonu olarak da adlandırılır. *C. pneumoniae* infeksiyonunda hayvan rezervuarı yoktur. İnsandan insana geçiş ise tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bakterinin birçok ülkede endemik olarak bulunduğu, özellikle antikör prevalansının düşük olduğu ülkelerde ani patlamalar ve epidemiler yapmakta olduğu düşünülmektedir. İnfeksiyon yıl boyu görülebilir.

Çeşitli ülkelerde yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, infeksiyon insidansı %50 civarında bulunmuştur. ABD’de yapılan prospektif çalışmalarda toplumdan edinilmiş pnömonilerde *C. pneumoniae* etkeni % 6-10 oranında saptanmıştır, İsviçre’de yapılan benzer çalışmada ise bu suşta rastlanmamıştır. Hastane dışında pnömoni geçiren kişilerin %10-21’inde serolojik olarak geçirilmiş *C. pneumoniae* infeksiyonu saptanmıştır (1).

## 1.2.2. *Mycoplasma pneumoniae*

### 1.2.2.1. Tarihçe:

Eaton ve arkadaşlarının 1944’teki primer atipik pnömoni (PAP) etkenini ayırma çalışmalarından sonra, ilk kez 1961’de besiyerinde üretilen *M. pneumoniae*, bu hastalığın etkeni olarak tanımlanmıştır (33).

### 1.2.2.2. Mikrobiyolojik özellikler:

*M.pneumoniae*, *Mollicutes* sınıfının *Mycoplasmatales* takımındaki *Mycoplasmataceae* ailesinde yer alan bir türdür. *Mycoplasma* cinsindeki bakteriler, ortalama 330 nm olan büyüklükleriyle hücre içermeyen karmaşık yapıdaki besiyerlerinde üreyebilen en küçük mikroorganizmalardır; hücre duvarları yoktur ve üreyebilmek için kolestrole ihtiyaç duyarlar (33).

*M.pneumoniae*, aerobik olarak üreyen, glikozu enerji kaynağı olarak kullanmak üzere fermante ederek çeşitli asit ürünler oluşturan, 10x200 nm büyüklüğünde küçük bir basildir. Besiyerine konan tetrazolyum boyasını maviden sarıya dönüştürmesi, kobay ve civciv eritrositlerini adsorbe etmesi, hidrojen peroksit üretimi sonucu katı besiyerine eklenen eritrositleri eritmesi tanımlanmasında kullanılan önemli özelliklerdir. Konak hücre membranlarına tutunmasını bir ucunda bulunan bir organel sayesinde gerçekleştirir. Bu organelden soyutlanan P1 peptidinin iyi bir antijenik yapı gösterdiği ve solunum epiteline yapışmadan sorumlu olduğu saptanmış ve aşırı yapısında kullanılabileceği düşünülmüştür. Diğer mikroorganizmalara göre geç üreme gösterir. Bölünme zamanı yaklaşık olarak 6 saattir. Klinik örnekten ilk soyutlandığında koloni morfolojisi de diğerlerinden farklı olup sahanda yumurta değil, dut şeklinde üreme gösterir (34,35).

### 1.2.2.3. Patojenite:

*M. pneumoniae* solunum yolu epiteline yüksek afinite gösterir. Epitel ve eritrositlerde bulunan siyaloglikoproteine terminal peptid P1 aracılığı ile yapışır. Silier epitele tabanından yapışarak hücredeki değişiklikleri ekstrasellüler olarak gerçekleştirir. Hemoliz ve hücre hasarından hidrojen peroksit salınımı sorumludur. Mikoplazmalar arasında hidrojen peroksit salınımı yapan tek türdür (36). Diğer mikoplazmalar gibi poliklonal T ve B hücre aktivasyonuna yol açabilirler. Lenfosit ve makrofaj uyarımı ile koloni stimulan faktörler ve interferon dahil olmak üzere pek çok sitokin artışına yol açar. İnfeksiyon sırasında oluşan antikorların bir kısmı nötralizan antikor olup, bir kısmı da beyin, akciğer, kardiyolipin ve düz kaslara karşı oluşan otoantikorlardır. Otoantikorlar arasında en çok araştırılan soğuk aglütininlerdir. 1943’te Finland ve arkadaşları tarafından saptanan soğuk aglütininler +4 °C’de eritrositlerin kümelenmesine yol açar ve serum-eritrosit karışımı 37°C’ye ısıtılırsa kümelenme ortadan kalkar. Bu aglütininlerin eritrosit yüzeyindeki I antijenine karşı IgM yapısında antikorlar oldukları gösterilmiştir. Bir grup antijeni olan I antijeni tüm matür eritrositlerde bulunur. Bu antikorlar infeksiyonun 7. gününden itibaren oluşurlar, 2-3 haftada en yüksek düzeye ulaşırlar ve 2-3 ay yüksek kalırlar. Soğuk aglütininlere bağlı böbrek yetmezliği, hemoliz, coombs testi pozitifliği ve uç organlarda dolaşım bozuklukları bildirilmiştir. Orak hücre anemisi olan hastalarda daha yüksek titrede oluştukları ve mikrovasküler

yetmezliklere, parmak amputasyonlarına yol açtıkları gösterilmiştir. *M.pneumoniae* enfeksiyonlarında 2-3. haftadan itibaren komplemanı bağlayan antikorlar da oluşur ve 2-3 ay kalırlar. Hastalıktan korunmada IgG ve IgA antikorlarının oluşumu önemlidir. Hücrese bağışıklık da savunmada önemlidir ancak mikroorganizmanın eradikasyonu güçtür (36-39).

#### 1.2.2.4. Laboratuvar tanısı:

Klinik olarak başlangıçta hastalığın öngörülmesi son derece önemlidir. Rutin laboratuvar teknikleri çoğu hastada normal sınırlarda olduğundan tanıda fazla yarar sağlamaz. Hastaların 1/4 kadarında lökositöz ve 1/3'ünde eritrosit sedimantasyon hızında artış saptanır. Özgül tanıda mikroorganizmanın klinik örneklerden soyutlanması ya da *M.pneumoniae*'ye karşı antikor saptanması yöntemleri kullanılabilir. *M.pneumoniae*'nin kültürde üretilmesi zaman alır (yaklaşık 2 hafta) ve özel besiyerleri gerektirir. Kültür için alınan örnekler uygun transport besiyerinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. İçinde steroller, nükleik asit prekürsörleri gibi zenginleştirici faktörler içeren besiyerinde glikoz ve fenol kırmızısı varlığında glikoza etki ederek besiyerinin rengini sarıya dönüştürür. Katı besiyerinde ilk soyutlandığında klasik sahanda yumurta koloniler oluşturmaz, ancak pasajlarla bu görünümü kazanır. İlk üremesi bir iki haftada ve dut şeklinde koloniler halindedir. Mikroorganizmanın tanımlanmasında hidrojen peroksit üretimi, eritrosit hemolizi yapması, kobay ve civciv eritrositlerinin adsorbe edilmesi gibi özelliklerinden yararlanılır (40).

Soğuk aglütinasyon fenomeni hastalığa özgü değildir ve *M.pneumoniae*'li hastaların %30-50'sinde pozitif bulunur. Yine de 1:32 ve üzerindeki titrelere saptanması halinde anlamlıdır. Soğuk aglütininler; Adenovirus, EBV, RSV, *Legionella*, *C.psittaci* ve Rubella virus enfeksiyonlarında, kardiyovasküler hastalıklarda, lenfoproliferatif hastalıklarda, hemolitik anemiler ve karaciğer hastalıklarında da pozitif olabilir. Soğuk aglütininler ve kompleman fiksasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Kültür yöntemleri ile uzun sürede sonuç alınması serolojik yöntemlerin geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Hızlı tanı tekniklerinden serumda özgül antikorların ELISA ile gösterilmesi, rRNA komplementer DNA kullanılarak nükleotid sekanslarını saptanması (Gen prob) gibi yöntemler kullanılabilir. Spesifik IgG ve IgM antikorları göstermede ELISA oldukça kullanışlı bir yöntemdir (41). IgM antikorlar 7-10 günden sonra olumlu olur ve 4-6 haftada en yüksek düzeye ulaşırlar. Bu testin duyarlılığı %98, özgüllüğü %99 civarındadır. Tanıda, ELISA dışında indirekt hemaglütinasyon ve üreme inhibisyon testleri de kullanılabilirle birlikte serolojik tanı için en avantajlı test ELISA ve IFA ile IgM antikorların gösterilmesidir (36-38).

#### 1.2.2.5. Klinik belirtiler:

Klinik olarak *M.pneumoniae*'nin neden olduğu pnömonilerin ancak %2-5'i hastaneye yatmayı gerektirecek kadar ağırdır. Ateş, halsizlik ve baş ağrısı şeklindeki prodromal belirtiler 2-5 gün sürer. Mikoplazma nedenli solunum yolu enfeksiyonunda genellikle farenjit ve trakeobronşit gelişir. Pnömoni %10 civarında görülür. *M.pneumoniae* ve diğer atipik pnömoni etkenlerine ait özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir. Plevral efüzyon olguların %2-25'inde gelişir. Genellikle az miktarda, tek taraflı ve geçicidir. Çok nadir olarak bilateral ve masif sıvılar görülebilir (Tablo 1) (1).

Tablo 1 : Sık rastlana atipik pnömonilere ait özellikler

Anahtar özellik	<i>M. pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>L.pneumophila</i>
Yaş	5-20	>8	>30
Mevsim	Sonbahar-kış	Yıl boyu	Yıl boyu-yaz
Temas hikayesi	Hasta aile üyeleri	Kışla salgınları	Kontamine aerosoller
Altta yatan hastalık	Sık	?	Çok sık
Balgam	Mukoid	Mukoid	Mukoid-pürülan
Radyoloji	Alveolar yanma tarzında	Alveolar yanma tarzında	Erken konsolidasyon
Radyolojik değişim	Hızlı düzelme	Hızlı düzelme	Hızlı yayılma geç rezolüsyon
Plörezi	Nadir	Nadir	Sık

### 1.2.2.6. Epidemiyoloji:

*M.pneumoniae*'ya bağlı solunum yolu infeksiyonları, ya tek tek ya da aile içi salgınlar şeklinde görülürse de toplu yaşanan okul, kışla gibi yerlerde yaygın infeksiyonlara da neden olabilmektedir. Böyle yerlerde gelişen pnömonilerin yaklaşık %25-75'inden sorumludur. Pnömoni dışı solunum yolu infeksiyonları pnömonilerden on kat daha fazladır. Her yaşta görülebilir ancak yeni doğandaki infeksiyonları son derece ağır seyirlidir. Ilıman iklimlerde sonbahar aylarında sıklığı artar. Okula başlama zamanı da olduğu için bu dönemde çocuklarda fazla görüldüğü söylenebilir. Ancak bu relatif bir sıklık artışıdır. Üç yaşın altındaki çocuklar genellikle üst solunum yolu infeksiyonu şeklinde geçirirler. 5-20 yaş arasında bronşit ve pnömoni sıkır. Bulaşma öksürükle havaya saçılan damlacıklar aracılığı ile olmaktadır. Bulaş için yakın temas gereklidir. Inkübasyon dönemi 2-3 hafta kadardır (36).

### 1.2.3. *Legionella pneumophila*

#### 1.2.3.1. Tarihçe:

Lejyoner hastalığı tıbbın gündemine ilk defa, 1976 yılında Philadelphia'da "Amerikan Lejyon" toplantısına katılanlardan 221 kişide pnömoni gelişmesi ve bu kişilerin 34'ünün ölmesi ile gelmiştir. Ölenlerin biopsi materyallerinden izole edilen gram negatif bakteri *L.pneumophila* olarak adlandırılmıştır. Geriye dönük yapılan araştırmalar aynı otelde 1974 yılında bir toplantıya katılanlardan 11 kişide de benzeri bir hastalığın ortaya çıktığını göstermiştir. Ancak bu salgının nedeni, *L.pneumophila*'nın 1976 yılında saptanmasına kadar fark edilememiştir. Retrospektif çalışmalar *L.pneumophila* ile bilinen ilk epideminin 1965 yılında Washington'da bir psikiyatri hastanesinde saptandığını ortaya koymuştur. Bu salgında solunum yolu hastalığı gelişen 81 hastadan 15'i ölmüş ve hastaların saklanan serumlarının %85'inde *L.pneumophila*'ya karşı spesifik antikorlar saptanmıştır (42,43).

#### 1.2.3.2. Mikrobiyolojik özellikler:

*L. pneumophila*, *Legionellaceae* ailesine bağlı bir bakteridir. *Legionellaceae* ailesinde 30 dan fazla cins ve 50 den fazla serogrup vardır. Bu ailedeki bakterilerle ortaya çıkan infeksiyonların %90'ından *L. pneumophila* sorumludur. *L. pneumophila*'nın 14 serogrubu olup, bunlardan serogrup 1,4,6 infeksiyonların çoğunluğuna neden olur. *Legionella* bir çok toksin salgılamaktadır, ancak bunların virulans ile ilişkisi kesin değildir (44).

*Legionellaceae* ailesi üyeleri ince, mikrobiyolojik boyalarla zor boyanan, sporsuz, kapsülsüz, gram negatif kokobasillerdir. Klinik örneklerde 0,3-0,9 µm ile 1,5-5 µm boyutlarında görülürler, fakat kültürlerinde 20 µm uzunluğunda filamantöz yapıda olabilirler. Üremek için L-cysteine gereksinimleri vardır. Bu yüzden bu bakteriye spesifik besiyeri geliştirilmiştir. Ortamda demir tuzlarının varlığı üremelerini kolaylaştırır. Birçok tür zayıf oksidaz ve katalaz reaksiyonu verirler. Asakkarolitik, üreaz negatif, nitrat negatif ve jelatinaz pozitif özelliklere sahiptir. *L.pneumophila*, hippurati hidrolize etmesiyle diğer türlerden ayrılır (42).

### 1.2.3.3. Patojenite:

*Legionella* infeksiyonları, bakteri, çevre ve konak olmak üzere üç faktörün etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bakterinin konak organizmaya girişi solunum yolları ile olmaktadır. İnfeksiyonun oluşabilmesi için konak solunum yolları direncinin kırılmış olması gerekmektedir. Bu nedenle *Legionellaceae* ailesinde yer alan bakteriler fırsatçı patojenlerdir. Bütün *Legionella* türlerinin insanda infeksiyona neden olmadığı göz önüne alındığında, türe özgü bazı virulans kriterlerinden söz edilebilir. Toprak ve suda *Legionella* türlerinin yaygın olarak bulunması, insanların bu bakterilerle yoğun karşılaştığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Doğada yaygın olarak bulunan *Legionella* türlerinin sadece bir kısmının etken olduğu infeksiyonlarının solunum yolları direnci zayıflamış kişilerde görülmesi, bakteri, çevre ve konak ilişkisinin önemini vurgulamaktadır (43).

Önceleri *Legionella* türlerinin doğada serbest yaşadıkları sanılırken, çok geçmeden *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türü amipler içinde simbiyotik/paraziter bir yaşam sürdürdükleri anlaşılmıştır. Amip kistleri içinde, serbest yaşama göre dış etkilere ve biyositlere daha dirençli hale gelmektedir (45).

*Legionella* türleri doğada amip dışında biyofilm tabakalarda da çoğalma gösterilebilir. *Legionella* türü bakteriler yerleştikleri yüzeylerde slime üretmezler. Su depoları, soğutma kuleleri, ventiletor ve nebulizator gibi ortamlarda başka bakterilerin oluşturduğu çoğu kez biyolojik atık katmanları şeklindeki biyofilm yapılarının içine yerleşirler. Hastanelerde kullanılan katater, nazogastrik sonda, entübasyon tüpleri gibi araçların musluk suyu ile yıkanması ve dezenfekte edilmesi sonucunda mekanik olarak hastaya bulaşma gerçekleşebilir. Biyofilmlerde üreme hızları çok yavaşladığından metabolizmalarındaki biyokimyasal ara yollara etki gösteren biyositlere karşı dirençleri artmaktadır (43).

İnhalasyon ile ya da üst solunum yollarından aspire edilerek konak organizmaya giren patojen bakteri eğer konağın solunum yolları direncini bozan bir neden varsa, 2-10 gün içinde pnömoni ile sonuçlanan infeksiyon tablosu ortaya çıkmaktadır. *Legionella* infeksiyonuna karşı konak direncini bozan risk faktörleri arasında en iyi bilinenler sigara kullanımı, KOAH, kronik kardiyovasküler hastalıklar, böbrek yetmezliği, transplantasyon ve altta yatan bir hastalığa veya tedaviye bağlı immünsüpresyondur (44).

İnfeksiyondan bronşlar ve proksimal bronşiyoller etkilenmezken, terminal ve respiratuvar bronşiyoller tutulmaktadır. Solunum yollarında bakteri ile ilk karşılaşılacak hücre, alveolar makrofajlardır. Normal şartlarda inhalasyonla gelen bakteriler alveolar makrofaj fagositozu ile ortadan kaldırılırken patojen *Legionella* suşları fagozom-lizozom füzyonunu bloke ederek makrofaj içinde üremelerini sürdürürler. Sonuçta makrofajı patlatarak mononükleer ve polimorfonükleer fagositlerde aynı döngüyü gerçekleştirmek için ortama dökülürler (44). *Legionella* infeksiyonlarının akciğerde neden olduğu patoloji; salgılanan sitokinler ve toksik ürünleri etkisiyle makrofaj ve T lenfositlerin devamlı infeksiyon bölgesine çekilmesi, fakat bakterinin öldürülememesi temeline dayanır. Akciğer dokusunda polimorfonükleer nötrofil ve makrosit/makrofaj hücrelerinin oluşturduğu bir inflamasyon ortaya çıkmaktadır. Nekrotizan özellik taşıyan bu inflamasyon sonucunda abse oluşumu da gözlemlenmektedir (45,46).



#### 1.2.3.4. Laboratuvar tanısı:

Klinikte en sık karşılaşılan ve tedavi edilmezse ölümcül sonuçlar doğurabilen *Legionella* enfeksiyon formu Lejyoner hastalığıdır. Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan tanı yöntemleri daha çok Lejyoner hastalığına yönelik geliştirilmiştir.

Lejyoner hastalığının laboratuvar tanısı için en yaygın olarak kültür, serolojik yöntemler, direkt floresan antikor (DFA), üriner antijen saptanması ve PCR yöntemleri kullanılmaktadır (42).

#### **Kültür:**

Kültür; %100 özgüllüğü ile en güvenilir yöntemdir. İlk izolasyonda *Legionella* türlerinin kolay ürememeleri sonucu kültür duyarlılığı %70'tir. Kültür amacıyla başta balgam olmak üzere bronkoalveolar lavaj sıvısı, biyopsi materyali, boğaz sürüntüsü ve kan gibi çeşitli örnekler yanında epidemiyolojik amaçlar için kaynak araştırmasında çevresel örnekler de kullanılır. *Legionella* klinik laboratuvarında kullanılan standart besiyerinde üremediği için izolasyonunda özel besiyerleri gereklidir. Bu amaçla çeşitli antibiyotiklerin katılmasıyla seçici özellik kazandırılacak "Buffered Charcoal Yeast Extract- $\alpha$ -keto glutarate" (BCYE $\alpha$ ) besiyeri kullanılır (47). Besiyerinin içinde bulunan yeast extract bakteri için besin kaynağıdır. L-cysteine, demir bileşikleri ve  $\alpha$ -ketoglutarate *Legionella* üremesini uyarır. Aktif kömür ise, özellikle besiyerinin ışık teması sonucu oluşabilecek süperoksit radikalleri ve peroksit bileşiklerinin nötralize edilmesinde görev alır. Besiyerine katılan ACES (N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid) tamponu, *Legionella* üremesi için gerekli optimum pH'yı sağlamaktadır. Seçicilik için sıklıkla polymyxin B, anisomycin ve cefamandole veya vancomycin antibiyotikleri besiyerine eklenir (42).

İnkübasyon en az 5 gün boyunca, nemli ve % 2-5 CO<sub>2</sub>'li ortamda yapılmalıdır. *Legionella* kolonileri gri-beyaz renkte, yuvarlak, genellikle mukoid karakterdedir. Koloni mikroskobu ile incelendiğinde yüzeyin pürüklü olduğu, periferde kırmızı-mavi-yeşil röfle verdiği ve ışığın düzensiz kırılması sonucu buzlu cam görünümünde olduğu izlenir. Şüpheli kolonilerden koyun kanlı veya çikolata agar gibi rutin amaçlı besiyerlerine antibiyotik içermeyen BCYE agar ile birlikte paralel pasaj yapılır. *Legionella* türleri kanlı veya çikolata agarda üremezler. Zayıf biyokimyasal özellikleri nedeniyle *Legionella* türlerinin biyokimyasal testlerle tiplendirilmesi zordur. *L. pneumophila* türünü diğerlerinden ayırmak için hippurat hidrolizi testi kullanılabilir. Tür tiplendirmesinde en pratik yol serolojik yöntemlerdir. Kanlı agarda üremeyen, BCYE'de üreyen izolatların aglütinin serumlarla test edilmesi ile tanıya gidilir. Fakat *Legionella* türleri arasında görülebilen çapraz reaksiyonlar bu yöntemi kısıtlar. Bir diğer identifikasyon yöntemi DFA tekniğidir. Poliklonal antiserumlar kullanıldığında *Legionella* dışı bazı mikroorganizmaların çapraz reaksiyonu bu yöntemi kısıtlamaktadır. Ancak monoklonal antiserumla yapılan DFA özgül bir yöntemdir. İzolatların kesin tanısı, ayrıca, genetik analiz teknikleriyle konabilir. Bu amaçla DNA hibridizasyon temeline dayalı gen prob yöntemi kullanılmaktadır (46).

#### **Serolojik Yöntemler:**

Serolojik yöntemler geriye dönük tanıya yardımcı oldukları için genellikle epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu amaçla hasta serumunda antikor düzeylerini araştırmak için mikroagglütinasyon ve ELISA gibi teknikler geliştirilmişse de, en sıklıkla IFA tekniği kullanılır. Lejyoner hastalığında serolojik cevap IgM, IgG ve IgA ile ortaya çıkmaktadır. Konvelasan örneğin akut fazda alınmış örnekten en az 6 hafta sonra alınması gereklidir. Titrede 4 kat artış saptanması tanı koydurucudur. Bazı olgularda serokonversiyon görülmediği ya da geç dönemde geliştiği hatırlanmalıdır. Serolojik testleri duyarlılığı %80, özgüllüğü %96.99'dur (44).

### ***Direkt Floresan Antikor (DFA):***

Tanı yöntemleri üzerinde yapılan çalışmalar, hızlı tanı sağlaması açısından, örnekte doğrudan mikroorganizma veya ürünlerinin gösterilmesi noktasına yoğunlaşmıştır. DFA tekniği ile solunum sistemi salgılarından mikroorganizmanın saptanması ilk kullanıma giren yöntemlerdendir. Bu teknikte türe ve serogruba özgü dış membran proteinlerine karşı elde edilmiş monoklonal antikor kullanılır. Testin özgüllüğü %95'in üzerinde olmasına rağmen duyarlılığı çeşitli yayınlarda %20 ile %70 arasında değişmektedir (44).

### ***Üriner Antijen Saptanması:***

Lejyoner hastalığında üriner antijen saptanması için radioimmünassay (RIA), ELISA ve lateks aglütinasyon teknikleri kullanılabilir. RIA ve ELISA kitleri ticari olarak bulunabilmektedir. Bu yöntemin özgüllüğü %100'e yakın, duyarlılığı %80'dir. Lejyoner hastalığında antijenlerin idrarla atılımı bazı olgularda bir yıla varan süre ile devam etmektedir. Bu nedenle antijenüri teorik olarak akut enfeksiyonun kanıtı değildir. Yöntemi sınırlayan bir diğer faktör de sadece *L.pneumophila* serogrup I antijenlerinin saptanabilmesidir. Yine de olguların %80-85'inde enfeksiyondan *L.pneumophila* Serogrup I'in sorumlu olduğu göz önüne alındığında üriner antijen araştırması hızlı ve yüksek düzeyde özgül bir tanı aracı olarak yaygın kullanım alanı bulmuştur (48). Lejyoner hastalığının tanısında bugün dünya sağlık örgütünün (WHO) önerdiği sürveyans standartları içinde kültür yöntemi kadar üriner antijen pozitifliği de "kesin tanı kriteri" olarak kabul edilmektedir (42).

### ***Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):***

*Legionella* türlerinin klinik örneklerde doğrudan gösterilmesi ile ilgili son geliştirilen yöntem PCR'dir. Özgüllük ve duyarlılığının yüksekliği ile son yıllardaki çalışmaların odak noktası olmuştur. Genellikle hedef DNA bölgesi olarak *Legionella* türlerine özgül 5S rRNA geni, 16S rRNA geni veya mip geni seçilmektedir. Yöntemlerde duyarlılık 1 cfu/ml ile 35 cfu/ml arasında değişmektedir (49). PCR, çevresel örneklerde olduğu gibi balgam, bronkoalveolar lavaj, serum, idrar gibi klinik örneklerde de uygulanabilir. PCR testlerinin uygulanması için çeşitli cihazlara ve deneyime gereksinim olduğundan sadece referans laboratuvarlarda kullanılmaktadır. WHO'nun önerdiği sürveyans standartları halen PCR'ı sürveyans amaçlarına uygun bir tanı yöntemi olarak kabul etmemektedir (49,50).

### **1.2.3.5. Klinik belirtiler:**

*Legionella* enfeksiyonları subklinik enfeksiyon, nonpnömonik hastalık (Pontiac ateşi), pnömoni (Lejyoner hastalığı) veya ekstrapulmoner inflamatuvar hastalık şeklinde karşımıza çıkabilir. Subklinik enfeksiyon terimi pnömoni tablosu ortaya çıkmadan sadece serumda *Legionella* türlerine karşı antikor saptanması ile tanımlanmaktadır(44). *Legionella* türlerinin neden olduğu nonpnömonik hastalık, "Pontiac ateşi" adıyla anılır. Bir iki gün gibi kısa kuluçka döneminden sonra ateş, halsizlik, miyalji ve öksürük gibi grip benzeri belirtilerle karşımıza çıkan klinik tabloda akciğer bulgusuna rastlanmaz (46). Genellikle kendi kendine iyileşme eğilimindedir.

Lejyoner hastalığı, pnömonik form olarak da adlandırılır ve *Legionella* infeksiyonları arasında en sıklıkla karşılaşılan ve en ciddi klinik tablodur. Başlangıç aniden yükselen ateş, halsizlik, miyalji, baş ağrısı ve kuru öksürük ile kendini gösterir. Balgam çıkartılabiliyorsa inflamasyon hücreleri içerir. Fakat genellikle gram boyası ile bakteri görmek zordur. Özellikle kuru öksürük ile kendini gösteren atipik pnömoni tablosu *M.pneumoniae* ve *C.pneumoniae* etkenleri ile ayırıcı tanı gerektirir. Pulmoner infiltrasyonun hızlı gelişimi, diğer loblara ve diğer akciğere yayılım, diğer gram negatif basil pnömonilerini düşündürse de, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aminoglikozitlere cevap alınmaması, bu tanıdan uzaklaştırır (44).

Ağır seyreden *Legionella* pnömonisinde bakteriler kan akımı ile yayılım gösterebilirler. Bakteriyemi sonucunda plevral ampiyem, perikardit, miyokardit, endokardit, pankreatit, piyelonefrit, peritonit, sellülit, hepatik apse ve gastrointestinal apseler gelişmiş olgular tanımlanmıştır. Deri döküntüleri, ensefalit, artrit, akut böbrek yetmezliği ve miyoglobülineri gibi infeksiyon dışı komplikasyonlar da görülebilmektedir. Ekstrapulmoner inflamatuvar hastalık tablosu genellikle pnömoniden sonra gelişmektedir. Pnömoni bulgusu olmadan geliştiği nadir olgular da bildirilmiştir (42).

### 1.2.3.6. Epidemiyoloji:

*Legionellaceae* içinde yer alan bakterilerin gerçekte doğal ekolojik ortamı sudur. Nehirler, göller, termal sular, çamurlar ve kaynaklar *Legionella* cinsi bakteriler içerirler. Doğadan insana bulaş dört halkalı bir zincir şeklinde tanımlanabilir. Birinci halka yaşadıkları doğal sulardır. İkincisi bakterinin üreyerek doğal konsantrasyonlara çıkmasına izin veren amplifikasyon faktörleridir. Üçüncü halka bakterinin duyarlı popülasyona ulaşmasında aracı mekanizmalardır. Son halka ise bakterinin yerleşip infeksiyona neden olabildiği konaktır. Zincirin ikinci ve üçüncü halkasını insan yapımı faktörler oluşturur. Yapılan araştırmalar büyük binaların %50'den fazlasının su sistemlerinde *Legionella* türlerinin bulunduğunu göstermektedir. Gerçekte doğal sularda düşük konsantrasyonlarda bulunan bakteriler az sayıda şebeke suyuna geçebilirler. Ancak binaların su sistemlerinde üremeye uygun ortam (ölü boşluklar, suyun durgun olduğu alanlar) bularak çoğalırlar. Su tesisatında yaygın şekilde bulunabilen biyofilm katmanları da bakterinin üremesinde çok önemli rol oynar. Su sistemlerinde *Legionella* bakterilerinin en sıklıkla üreme gösterdiği bölgeler şunlardır: merkezi klima ve havalandırma sistemleri ile soğutma kuleleri, sıcak su tankları, su yumuşatma, duş başlıkları ve sıcak su muslukları, termal banyolar, çamurlar ve kaplıcalar, hastane solunum tedavi ekipmanları, evaporatörler ve nebulizatörler (45).

*Legionella* türlerinin insana bulaşmasında aerosolizasyon ve aspirasyon rol oynamaktadır. Aerosolizasyon ile bulaşma için bakteriyi içeren suyun, solunacak büyüklükte aerosol partiküller (1-5µm) haline gelmesi gereklidir. Su sisteminde çoğalma olanağı bulan bakteri, klima ya da duş başlığı gibi suyu aerosolize eden araçlarla ortama dağılmakta ve duyarlı kişiler tarafından solunmakta ya da aspire edilmektedir. *Legionella* damlacıklar içinde ortamda 2 saatten fazla kalabilirler ve hava akımlarıyla 1.5-3.0 km uzağa taşınabilirler. Hastaların solunum yollarına doğrudan uygulanan tedavi edici aletler kontamine iseler aerosolizasyona gerek duyulmaksızın aspirasyon yoluyla bulaşma yaratılabilirler (48).

## 1.5. VİRAL PNÖMONİLER

Çocuklarda ve erişkinlerde viral üst solunum yolu infeksiyonları çoğunlukla kendiliğinden iyileşir, nadiren pnömoniye yol açar. Pnömoni daha çok altta yatan kronik akciğer ya da kalp hastalığı olanlarda, bağışıklık sistemi yetersiz olanlarda ve yaşlılarda görülür. En sık rastlanan viral pnömoni etkenleri; İnfluenza A ve B, RSV, Parainfluenza ve Adenoviruslardır (43).

### 1.4.1. İnfluenza ve Parainfluenza virusları

Influenza A ve B viruslarının ikisinde pnömoni etkeni olmakla birlikte, büyük epidemilerde mortalite çoğunlukla İnfluenza A virusuna bağlıdır. Sağlıklı kişilerde viral pnömonilerin büyük bölümünden İnfluenza virusları sorumludur. İnfluenza epidemileri sırasında İnfluenza'ya bağlı ölümler pnömoniye, kardiyopulmoner hastalığın veya altta yatan kronik hastalığın alevlenmesine bağlı olmaktadır. İnfluenza infeksiyonu alt solunum yollarında üç farklı klinik tabloya neden olur: trakeobronşit, primer viral pnömoni, sekonder bakteriyel veya kombine viral-bakteriyel pnömoni (43,59).

Parainfluenza tip 1,2 ve 3 çocuklarda görülen laringotrakeobronşitin en sık rastlanan etkenidir. Tip 3, çocukluk çağı pnömoni veya bronşiyolitinin yaklaşık %10-15'inden sorumludur. Tip 1 ve 3 erişkinlerde üst ve alt solunum yolu infeksiyonlarına yol açar (60,63).

### 1.4.2. Respiratuvar sinsityal virus:

Çocuklarda alt solunum yolu infeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri olan RSV, erişkinlerde de üst ve bazen alt solunum yolu infeksiyonlarına yol açmaktadır. A ve B serogrubuna bağlı infeksiyon klinik bulguları birbirine benzer. En sık bir yaşın altında hastalığa neden olur. Hayatın ilk birkaç yılında tüm bebekler bu virüsle infekte olur ancak tam bir bağışıklık gelişmediği için infeksiyonun tekrarlamasına sık rastlanır. Bebeklerde en sık hastaneye yatış gerektiren alt solunum yolu infeksiyonudur. RSV pnömonisi premature bebeklerde, bronkopulmoner displazi veya konjenital kalp anomalisi olanlarda, düşükün yaşlılarda, kronik akciğer hastalığı olanlarda, immün yetmezliği olanlarda, özellikle kemik iliği transplantasyonu yapılanlarda daha ağır seyreder. Kış ilkbahar aylarında ortaya çıkan salgınlar, bronşiyolit ve pnömoni tanısıyla bebeklerin hastaneye yatışında belirgin artışa neden olur. Nazokomiyal yayılma önemli bir sorundur, salgınlar sırasında hastanede yatan hastaların %20-45'i hastanede RSV ile infekte olabilir, bunların %20-50'si alt solunum yolu hastalığı geçirir. Hastane personelinin de %50'si virüsle infekte olur. (61). RSV erişkinlerde kronik bronşit alevlenmelerine neden olabilir (61-63).

### 1.4.3. Adenoviruslar:

Çocuklarda bronşiyolit ve viral pnömonilerin yaklaşık %5-10'undan sorumlu bulunmuştur. On yaşındaki çocukların çoğu bu yaşa kadar bir yada daha fazla adenovirus serotipi ile infekte olmaktadır. Tip 3,7 ve 21, 3-18 aylık bebeklerde dissemine hastalığa neden olurken tip 7 ve 21 bebeklerde adenoviral pnömoniye en sık neden olan tipleridir. Tip 3,4 ve 7 askeri kışlalarda erişkinlerde alt solunum yolu infeksiyonu salgınları yapar. Salgınlar sonbahar, kış ve ilkbaharda ortaya çıkar. Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda ağır adenoviral pnömoniler görülebilir (43).

#### 1.4.4. Viral etkenlerde laboratuvar tanısı:

Viral etkenlerin tanısında hücre kültür yöntemleri, çok uzun zaman alması ve gelişmiş laboratuvar olanakları gerektirmesi nedeniyle referans merkezleriyle sınırlı olarak uygulanabilmektedir. Bu etkenlere yönelik tanı daha çok serolojik testlerle konulmaktadır. Viruslara karşı gelişen antikorların saptanmasında başta ELISA ve IFA yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda nükleik asit yöntemi de bu etkenlerin tanısında kullanım alanı bulmuştur (64).

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

Mayıs 2002 – Mayıs 2003 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıklar bölümünde yatarak ve ayakta tedavi olan 42 erkek, 36'sı kadın olmak üzere, toplam 78 hastadan alınan serum örnekleri; *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* başta olmak üzere, atipik pnömoni etkenlerinin varlığı yönünden incelendi. Hasta seçimi sırasında hastalardan; atipik pnömoni belirtileri ve KOAH, astma, sık alt solunum yolu geçirmeleri kriterlerinden birini ya da daha fazlasını taşıyanlar öncelikle tercih edildi. Hasta seçimi sırasında yaş faktörü göz önünde bulundurulurken, cinsiyet faktörü göz önüne alınmadı.

Kan örnekleri semptomların görüldüğü akut evrede toplandı. Santrifüjde 5000 devirde 3,5 dakikada serumları ayrıldı ve -20 °C'de saklandı. Her hastaya ait, hasta bilgileri içeren formlar dolduruldu. Sağlıklı bireylerden 28 kişilik bir kontrol grubu oluşturuldu.

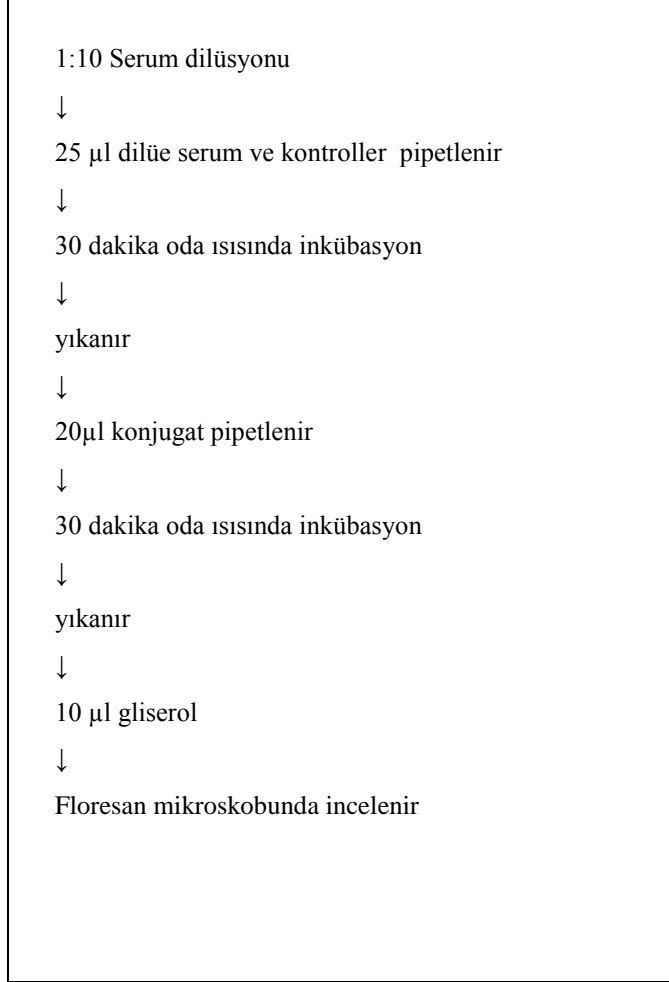
Çalışmaya başlamadan önce serumlar oda sıcaklığında çözündürüldü ve vorteksle karıştırıldı. Örneklerden ilk olarak, Euroimmun (Almanya) firmasına ait biyoçip slide yöntemiyle dizayn edilmiş solunum patojen panelinde IFA yöntemi ile; *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L pneumophila*, Influenza A-B, Parainfluenza Tip 1-2-3-4, Adenovirus, Respiratuvar Sinsityal Virus IgM antikorları araştırıldı. Biyoçip slide dizaynında birden fazla patojene ait antijenler yan yana dizilerek aynı hasta serumu ile çalışılmasına olanak sağlamaktaydı. Örnekler, aşağıda kısaca tanımlandığı üzere üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı (Şekil 1).

Euroimmun solunum patojen paneli IgM IFA kit içeriği;

- . Biyoçip slide (2 profilli 10 adet slide)
- . Pozitif kontrol
- . Negatif kontrol
- . Konjugat (IgM, 1 şişe 0,6 ml)
- . Fosfat tamponu (toz halinde 2 paket, pH 7,2)
- . Tween 20 (2 şişe, 2 ml)
- . Gliserol (pH 8,4, 3 ml)
- . Lameller (12 adet)

Hazırlanan fosfat tamponuyla serumlar 1: 10 oranında dilüe edildi. Dilüe edilmiş serumlardan ve kontrollerden 25µl reaksiyon tablasına pipetlendi ve biyoçip slaytlar örneklerin üzerine ters olarak kapatıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra yıkama aşamasına geçildi. Yıkama yaparken önce slaytları üzerine 1 saniye gibi kısa bir süre fosfat tamponu döküldü, ardından 5 dakika içerisinde fosfat tamponu bulunan yıkama tankında bekletildi, çıkartılıp havada kurutuldu. Reaksiyon tablasına 20 µl konjugat pipetlendi, slaytlar ters olarak kapatılıp 30 dakika oda

sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar yıkama ve kurutma işlemi yapıldıktan sonra biyoçiplerin üzerine birer damla gliserol damlatılarak lamel kapatıldı. Nikon ES-200 (Japonya) marka floresan mikroskopunda inceleme yapıldı. Antijen tipine göre, parlak yeşil floresan patern veren örnekler pozitif olarak değerlendirildi.



ŞEKİL 1: Biyoçip slayt yöntemi test prosedürü akış diyagramı

Daha sonra örneklerden *M.pneumoniae* IgA ELISA (Euroimmun, Almanya) yöntemi ile, *C.pneumoniae* IgM ve IgA Mikro immün floresan antikor (MIF) yöntemi ile (Focus, USA), *L.pneumophila* total antikorları ise IFA yöntemiyle (Focus, USA) çalışıldı.

Focus *M.pneumoniae* IgA ELISA kit içeriği;

- . Antijenle kaplanmış mikrolept kuyucukları (96 test)
- . Kalibrasyon serumu
- . Pozitif kontrol
- . Negatif kontrol
- . Enzim konjugat
- . Dilüent
- . Yıkama tamponu

. Kromojen – substrat

. Stop solüsyonu

*M.pneumoniae* IgA, çalışma prosedürüne göre; serumlar 1:101 oranında dilüe edildi. Dilüe serumlar ve kontroller, mikropleyt kuyucuklarına 100'er µl pipetlendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama işlemi; kuyucuklardaki numuneler aspire edildikten sonra, her bir kuyucuğa 300'er µl 1:10'luk fosfat tamponu koyulmak ve 1 dakika beklemek suretiyle 3 kez tekrarlandı. Kuyucukların üzerine 100 µl konjugat pipetlenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Tekrar yıkama işlemi yapılarak kuyucuklara 100 µl substrat solüsyonu eklendi, 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon bloke edildi ve 450 nm'de ELISA okuyucusunda kolorimetrik ölçüm yapıldı. Elde edilen optik dansite (OD) sonuçları cut-off değerine göre değerlendirildi (Şekil 2).

1:101 serum dilüsyonu

↓

100 µl örnek ve kontroller kuyucuklara pipetlenir

↓

30 dakika oda ısısında inkübasyon

↓

3 defa yıkanır

↓

100 µl konjugat pipetlenir

↓

30 dakika oda ısısında inkübasyon

↓

3 defa yıkanır

↓

100 µl substrat pipetlenir

↓

30 dakika oda ısısında inkübasyon

↓

100µl stop pipetlenir

↓

450 nm'de OD okunur

Şekil 2: *M. pneumoniae* ELISA test prosedürü akış diyagramı

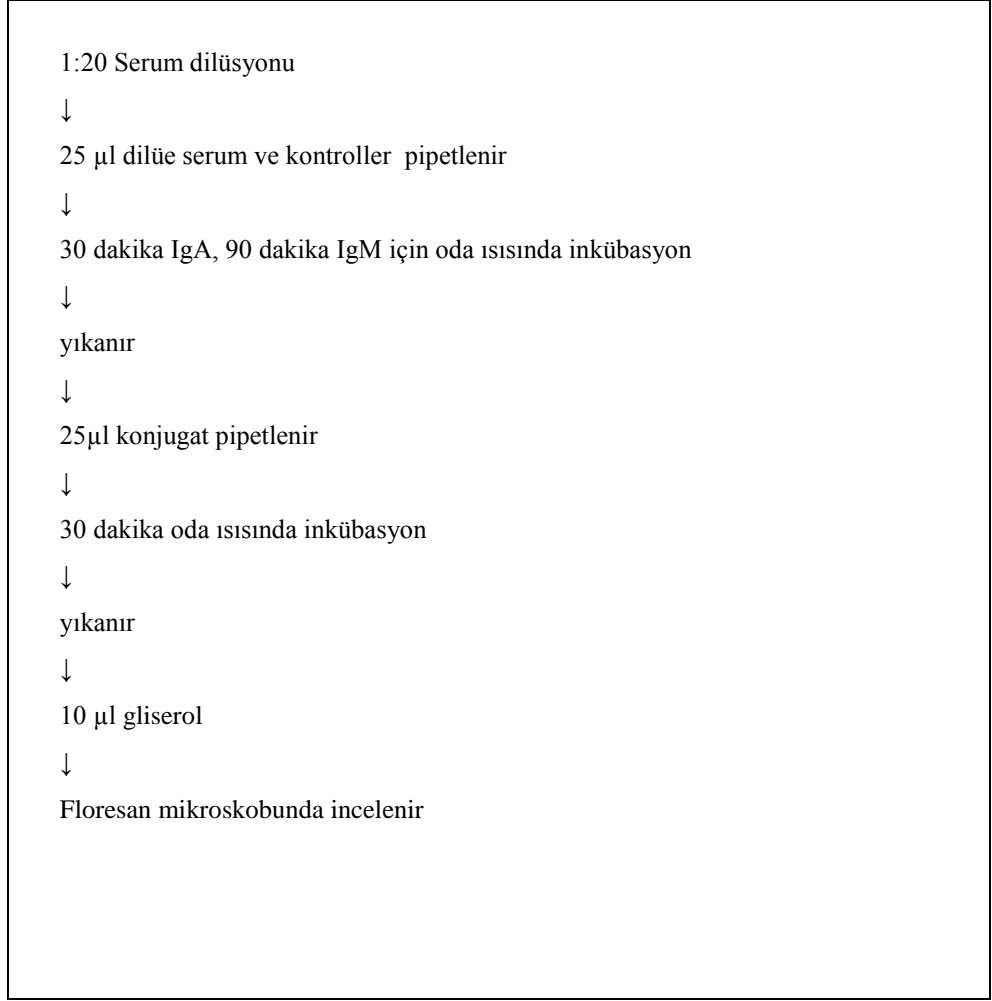
*C. pneumoniae* IgM ve IgA MIF yöntemi üretici firmanın test prosedürüne göre çalışıldı. Her slide alanında bulunan kontroller ile paralel işlem yapıldı.

Focus *C. pneumoniae* IgM ve IgA MIF kit içeriği;

- . *Chlamydia* MIF substrat slide (10'ar adet)
- . Konjugat IgM ve IgA (1'er şişe 3,5 ml)
- . Pozitif kontroller
- . Negatif kontroller
- . Dilüent (12'şer ml)
- . Gliserol (2,5'ar ml)
- . Fosfat tamponu (toz halde 2'şer poşet)

Önce liyofilize fosfat 1 litre suda çözündürüldü. Serumlar fosfat tamponu ile 1:20 oranında dilüe edildi. Dilüe serumlar ve kontroller slaytlardaki yerlerine 25 µl pipetlendi, üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 37°C'de IgM 90 dakika, IgA ise 30 dakika inkübe edildi. Yıkamayı yaparken önce slaytları üzerine 1 saniye gibi kısa bir süre fosfat tamponu döküldü, ardından 10 dakika içerisinde fosfat tamponu bulunan yıkama tankında bekletildi, çıkartılıp havada kurutuldu. Slaytlardaki numune yerleri üzerine 25 µl konjugat pipetlendi ve üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tekrar yıkama ve kurutma işlemi yapıldıktan sonra slaytlara gliserol damlatılarak lamel kapatıldı ve floresan mikroskopunda incelendi (Şekil 3).





Şekil 3: *C. pneumoniae* IgM ve IgA MIF test prosedürü akış diyagramı

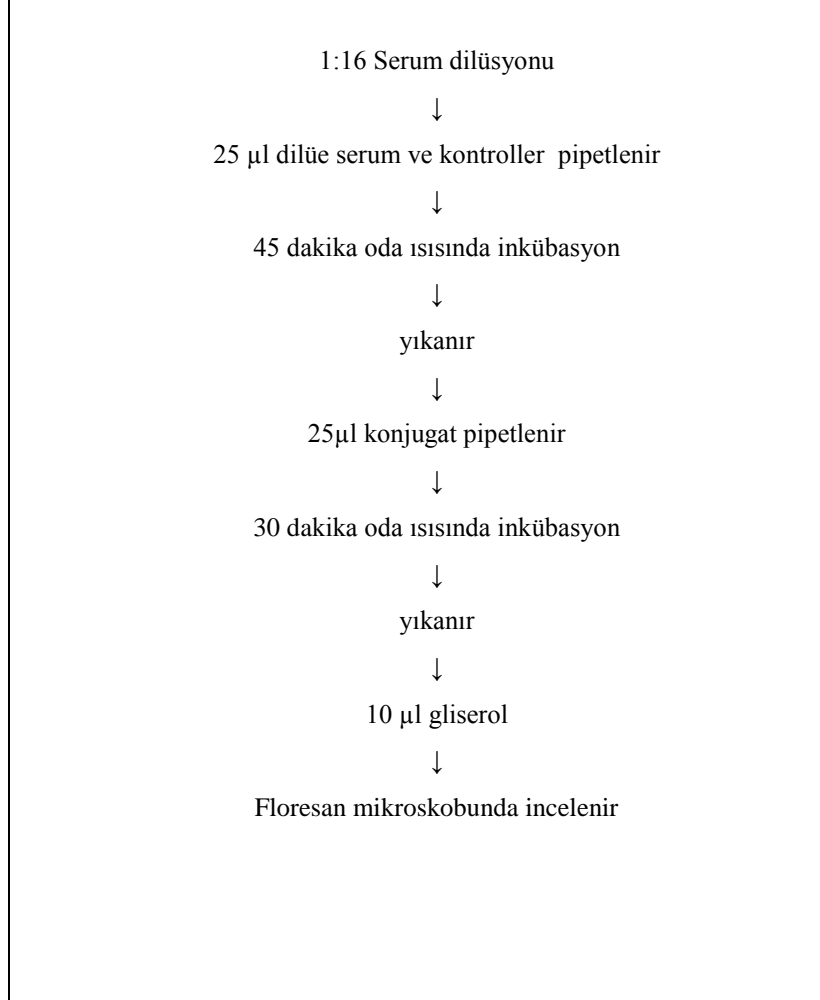
*L. pneumophila* IFA test prosedürüne göre çalışıldı.

Focus *L. pneumophila* IgM IFA kit içeriği;

- . *Legionella* substrat slide (10 adet)
- . Konjugat (IgM)
- . Polivalan pozitif kontrol
- . Negatif kontrol
- . Dilüent
- . Gliserol
- . Fosfat tamponu (toz halinde, 2 poşet)

Önce liyofilize fosfat 1 litre suda çözündürüldü. Serumlar fosfat tamponu ile 1: 16 oranından başlayarak seri dilüsyonlar yapıldı. Dilüe serumlar ve kontroller slaytlardaki yerlerine 25 µl pipetlendi, üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 37°C’de 45 dakika inkübe edildi. Yıkamayı yaparken önce slaytları üzerine 1 saniye gibi kısa bir süre fosfat tamponu döküldü, ardından 20

1 dakika içerisinde fosfat tamponu bulunan yıkama tankında bekletildi, çıkartılıp havada kurutuldu. Slaytlardaki numune yerleri üzerine 25 µl konjugat pipetlendi ve üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tekrar yıkama ve kurutma işlemi yapıldıktan sonra slaytlara gliserol damlatılarak lamel kapatıldı ve floresan mikroskopunda incelendi (Şekil 4).



Şekil 4 : *L. pneumophila* IFA test prosedürü akış diyagramı

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçların istatistiki değerlendirilmesinde SPSS for Windows 10,0 paket programında Ki-kare Fischer exact testi kullanıldı.

C Reaktif Protein (CRP) değerleri nefelometri yöntemi ile, lökosit değerleri kan sayımı cihazı ile çalışıldı.

### 3.BULGULAR

Çalışmaya alınan 78 hastadan alınan serum örnekleri; *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* ve *L. pneumophila* başta olmak üzere, atipik etkenlerin varlığı yönünden araştırıldı.

Örneklerin 42'si erkek, 36'sı bayan hastalardan alındı. Yaş ortalamaları 58,8 olan hastaların yaşları 21-83 arasında değişiyordu. Serum örneği alınan hastaların tümü atipik pnömoni semptomları gösterirken, 19 hasta (%24,3) KOAH, 10 hasta (%12,8) astma ve 2 hasta (%2,5) sık geçirilmiş pnömoni öyküsüne sahipti. Hastaların 34'ü (%43,5) öksürük, 32'si (%41) balgam çıkarma, 12'si (%15,3) gece terlemesi ve 6'sı da (%7,6) yan ağrısı şikayetleri ile hastanemize başvurmuşlardı.

Hastaların 34'ünde (%43,5) CRP yüksekliği, 21'inde (%26,9) lökositoz saptandı. Hastaların balgam kültürü sonuçlarına baktığımızda; 12 hastada (%15,3) *S.pneumoniae*, 1 hastada (%1,2) *H.influenzae*, 1 hastada ise (%1,2) *Serratia odorifera* üredi. Hastaların ARB sonuçları ise; 1 hastada (%1,2) ARB +++, 1 hastada (%1,2) ARB ++, 2 hastada (%2,5) ARB + olmak üzere toplam 4 hasta pozitif olarak bulundu.

Çalışmaya alınan toplam 78 hastanın 30'unda (%38,4) *C. pneumoniae* IgM, 36 hastada (%46,1) *M. pneumoniae* IgM, 1 hastada (%1,2) *L. pneumophila* IgM pozitif bulundu. Test grubu ile aynı tarihler arasında hastanemize başvuran check-up hastalarından bir kontrol grubu oluşturuldu. Test ve kontrol grubu sonuçları karşılaştırıldığında test grubunu pozitifliğinin kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptandı. *C. pneumoniae* için bu oran 30/4, *M. pneumoniae* için 36/1 iken *L. pneumophila* için kontrol grubunda pozitiflik saptanmadı (Tablo 2).

Tablo 2: *C. pneumoniae* ve *M. pneumoniae* IgM ve IgA pozitifliklerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması

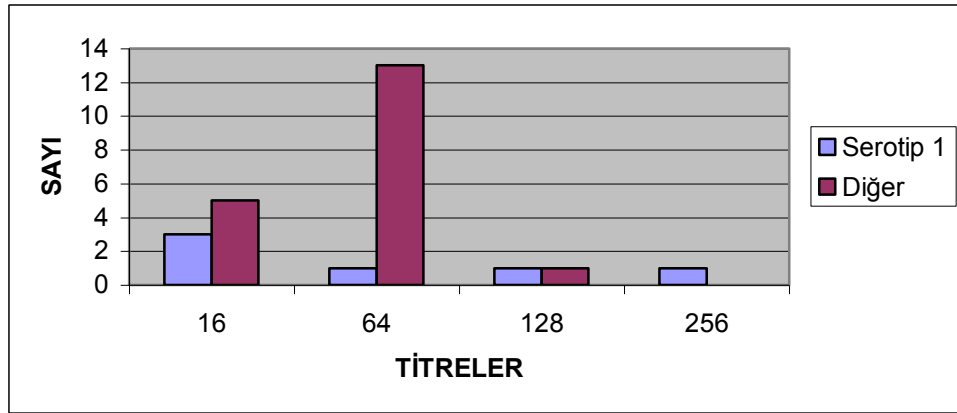
	HASTA (n=78)	KONTROL (n=28)	P
<i>C. pneumoniae</i> IgM	30	4	P < 0,05
<i>C. pneumoniae</i> IgA	20	1	P < 0,001
<i>M. pneumoniae</i> IgM	36	1	P < 0,001
<i>M. pneumoniae</i> IgA	23	1	P < 0,01

*C. pneumoniae* ve *M. pneumoniae* pozitif olan hastalar, IgM ve IgA açısından değerlendirildiğinde, 30 hastanın (%38,4) *C. pneumoniae* IgM'i, 17 hastanın (%21,79) *C. pneumoniae* IgA' pozitif olduğunu gördü. *M. pneumoniae*'da ise 36 hastanın (%46,1) IgM'i, 23 hastanın ise (%29,4) IgA pozitif bulundu. Test grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genel sonuçlarda olduğu gibi test gruplarının kontrol gruplarına üstünlük sağladığı gördü. *C. pneumoniae* IgM için bu oran 32/4 ve IgA için 17/1 olarak saptanırken, *M. pneumoniae* IgM için 36/1 , IgA için 23/1 olduğu saptandı. (Tablo 3)

TABLO 3: *C. pneumoniae* 'nin hasta ve kontrol gruplarındaki IgM ve IgA pozitiflik sayıları

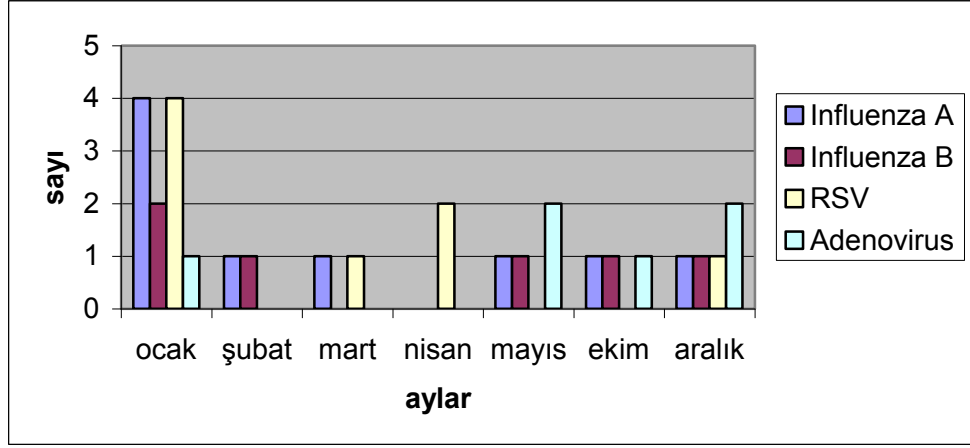
n=78	HASTA	KONTROL
C. pneumoniae	IgM : 32	4
	IgA : 17	1
M. pneumoniae	IgM : 36	1
	IgA : 23	1

Hastalar, *L. pneumophila* açısından titrasyona tabi tutularak değerlendirildi ve *L. pneumophila* IgM pozitifliği olan bir hasta 1:256 titrede (%1,2) pozitiflik bulundu (Şekil 1).

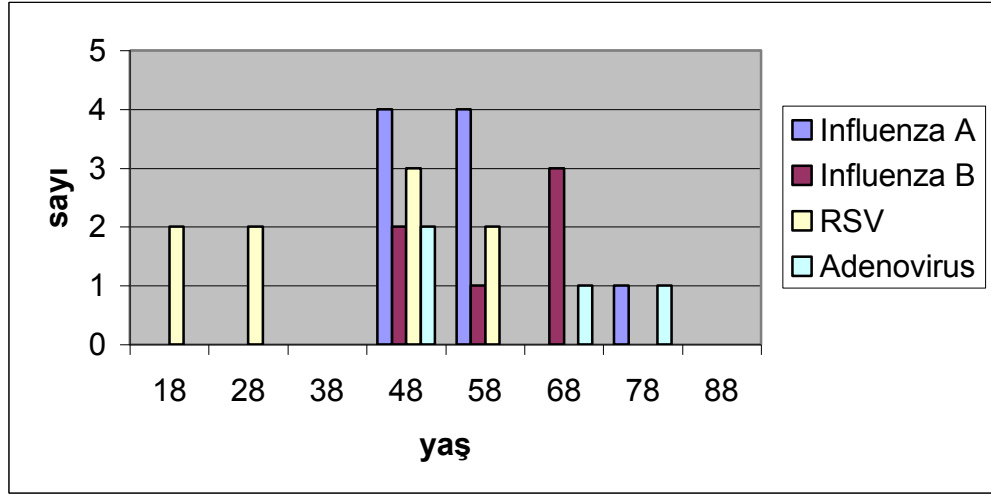


Şekil 5: Değişik titrelerde *L. pneumophila* pozitiflik sayıları (n=78)

Hastalar Influenza A ve B, RSV ve Adenovirus IgM açısından da değerlendirildi. Hastaların 12'sinin (%15,3) Influenza A, 7'sinin (% 8,9) Influenza B, 9'unun (%11,5) RSV ve 2'sinin de Adenovirus açısından pozitif görüldü. Virusların mevsimlere ve yaşlara göre dağılımı incelendiğinde; en çok kış ayları olmak üzere, bahar ve güz dönemlerinde yaygın olduğu görüldü (Şekil 2,3).



Şekil 6: Virusların aylara göre pozitiflik sayıları (n=78)



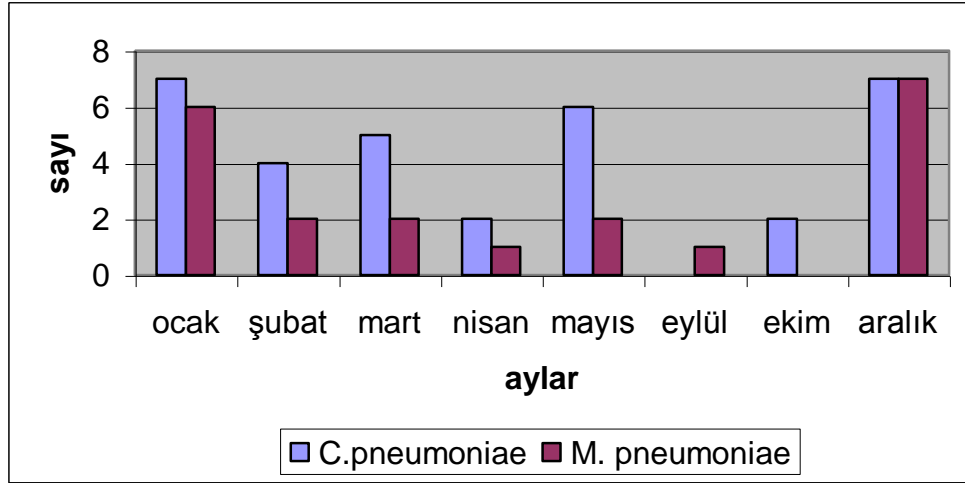
Şekil 7: Virusların yaşlara göre pozitiflik sayıları (n=78)

*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*'ye virusların da eşlik ettiği durumlar görüldü (Tablo 4).

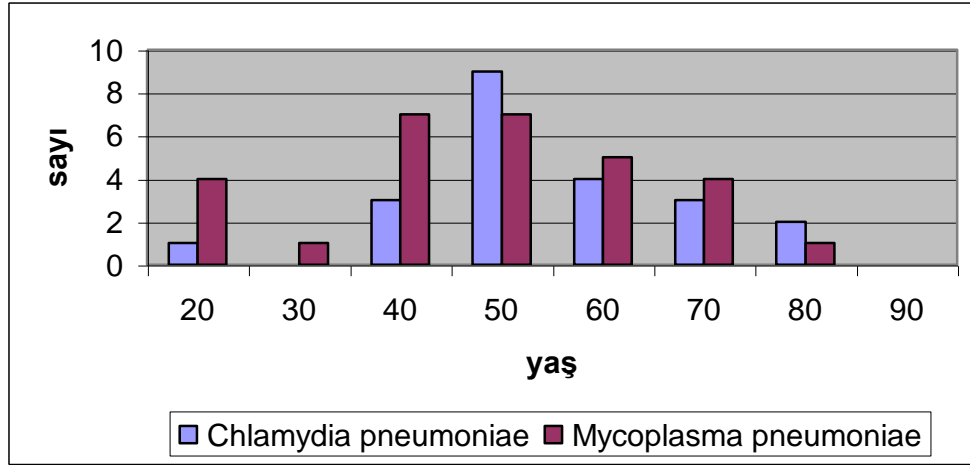
Tablo 4: *M. pneumoniae* ve, *C. pneumoniae* ile viral etkenlerin birlikteliği.

N=78	Influenza A	Influenza B	RSV	Adenovirus
<i>M. pneumoniae</i>	7	2	7	1
<i>C. pneumoniae</i>	1	3	3	-

*M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* pozitifliklerinin aylara göre dağılımı incelendi. *M. pneumoniae* kış aylarında en yüksek düzeye ulaşır zamanla düzenli olarak azaldığı görüldü. *C. pneumoniae*, benzer bir grafik gösterirken baharda tekrar yükseldiği gözlemlendi (Şekil 4).

Şekil 8: *M. pneumoniae* ve, *C. pneumoniae* pozitifliğinin aylara göre dağılımı

*M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* pozitiflikleri yaşlara göre de incelendi. Pozitiflik daha çok 40 yaş üzerinde görülürken, en çok pozitiflik 50-60 yaşları arasında saptandı (Şekil 5).



Şekil 9: *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* pozitifliğinin yaşlara göre dağılımı

IFA yöntemiyle serumda atipik pnömoni etkenleri saptanırken, kültür ile balgamda aside rezistan boyama (ARB) yöntemiyle boyanan balgamda da bakteriyel pnömoni etkenleri de araştırıldı ve bu etkenlerin atipik etkenlerle beraber bulunduğu olgular görüldü (Tablo 5).

Yaş	<i>M.p</i>	<i>C.p</i>	<i>L.p</i>	<i>S.p</i>	<i>H.inf</i>	<i>Serratia</i>	ARB
67	+	+			+		
59		+		+			
57	+	+		+			
65	+			+		+	
43							
65		+					
49		+		+			
59	+		+	+			
68		+		+			
48		+					+
50	+						+++

Tablo 5: Atipik pnömoni etkenleriyle bakteriyel pnömoni etkenlerinin beraber görüldüğü olguların dökümü. (*M.p.*: *M. pneumoniae*, *C.p.*: *C. pneumoniae*, *L.p.*: *L.pneumophila*, *S.p.*:*S.pneumoniae*).

TABLO 6: *M. pneumoniae*, *C.pneumoniae* ve *L. pneumophila* ile birlikte görülen CRP yüksekliği ve lökositozlu hasta sayıları.



ETKENLER	CRP	WBC
<i>M. pneumoniae</i> ( n=36 )	10	4
<i>C. pneumoniae</i> ( n=30)	14	6
<i>L. pneumophila</i> ( n=1)	1	1

#### 4. TARTIŞMA

Alt solunum yolu infeksiyonları bölgemizde önde gelen sağlık sorunları arasındadır. Klasik etkenlerin yol açtığı pnömoninin yanında, atipik patojenler de gittikçe sık görülmektedir. Atipik pnömoniden sorumlu başlıca bakteriyel etkenler; *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* ve *L. pneumophila* olarak sayılabilir. Balgamsız veya az miktarda mukoid balgamin eşlik ettiği, öksürüğün günler içinde artış gösterdiği, ateşin düşük derecede seyrettiği ve akciğer muayenesinde grafi bulguları ile uyumsuz olarak pek az dinleme bulgusunun olduğu bir tablo oluşturduğundan klinik teşhisi oldukça zor bir hastalıktır. Bu gibi durumlarda laboratuvar bulgularının önemi ortaya çıkmaktadır. Patojenlerin kültürde üreyememeleri veya üremelerinin zor ve zaman alıcı olmasından dolayı kültür pek tercih edilen bir yöntem değildir. Hastalığın hızlı tanısı için yapılan PCR gibi moleküler yöntemlerin pahalı olması ve geniş laboratuvar olanaklarına ihtiyaç duyması, bu konuda standardizasyonun sağlanamamış olması (65,66) serolojik yöntemlerin önemini öne çıkartmaktadır. Bütün bu olumsuz etkenlerin dışında kalan ve duyarlılığı ile de tercih edilen yöntem; IFA yöntemidir. Yaptığımız çalışmada IFA yöntemiyle yukarıda sayılan etkenlere karşı gelişen; IgM, IgA ve total antikor ve ELISA yöntemi ile IgA aranması gerçekleştirilmiştir.

Atipik etkenlerin ve bazı virusların hastane dışında gelişen ASYE'nin %20-40'ını oluşturduğu, toplum kökenli pnömonilerde viruslar dışındaki bu üç etkenin görülme sıklığının ise %10-20 arasında olduğu bildirilmiştir (1).

*M. pneumoniae*, hastane dışında gelişen atipik pnömonilerde viruslardan sonra en sık rastlanan etkenidir. ABD (Seattle) ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda tüm toplumdan edinilmiş pnömonilerin %15-18'inin *M. pneumoniae* kökenli olduğu bildirilmiştir. Başka bir geniş kapsamlı çalışma da hastanede yatarak tedavi gören 1300 pnömoni olgusunda *M. pneumoniae*'si oranı %4,9 bulunmuş, aynı grup içinde yaşı 65'in üzerindeki hastalarda ise bu rakam %9,3 olarak saptanmıştır. Yaz aylarında görülen pnömonilerin yaklaşık %50'sinden de aynı etken sorumludur. Genel olarak ise 5-20 yaşları arasında görülen pnömonilerin yaklaşık %30-60'ını *M. pneumoniae* pnömonileri oluşturmaktadır. *M. pneumoniae* 4-8 yılda bir, daha çok yaz sonu ve sonbaharda görülen epidemiler yapar. Sonbahar ve kış aylarında daha yoğun olmak üzere yıl boyu sporadik olarak pnömoni etkenidir (1). Slovenya'da yapılan bir çalışmada *M. pneumoniae* %5,7 oranında pozitif bulunmuştur(68). İspanyada yapılan bir çalışmada *M. pneumoniae* IgM %1,3 oranında pozitif bulunmuştur (67).

Çeşitli ülkelerde yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, *C. pneumoniae* infeksiyonu insidansı %50 civarında bulunmuştur. ABD'de yapılan prospektif çalışmalarda toplumdan edinilmiş pnömonilerde *C. pneumoniae* etkeni % 6-10 oranında saptanmıştır (1). 1990 yılında ABD'de Fang ve arkadaşları bir yıl boyunca inceledikleri 359 pnömoni olgusu ile 1960 yılından o güne dek yapılmış benzer çalışmaları karşılaştırmışlar, sonuçta toplumdan edinilmiş pnömonilerin etyolojisinde son 10 yılda bazı değişimlerin olduğu, *Legionella ssp* (%7) ve *C. pneumoniae*(%6) gibi etkenleri etyolojik sıralamada ilk beşin içinde yer aldıklarını gözlemlemişlerdir. 1992 yılında yayımlanan bir başka çalışmada da Grayston retrospektif olarak 200 pnömoni olgusunun çift serumlarını incelemiş ve olguların %8'inde akut *C. pneumoniae* infeksiyonu bulgusu saptamıştır.

Ancak yaşa bağlı atak hızı toplumdan topluma değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde 5 yaşın altındaki çocuklarda *C. pneumoniae* enfeksiyonu nadir iken gelişmekte olan ülkelerde serolojik çalışmalara dayalı veriler aynı yaş grubunda %6 kadar önemli oranlarda olduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak ise *C. pneumoniae*'nin ileri yaşlarda arttığını gözlemlemek mümkündür. Hastalığın (semptomatik veya asemptomatik) geçirildiğine dair kanıt olarak spesifik IgG antikorlarının araştırıldığı kapsamlı bir çalışmada 7 ülkenin erişkin yaş grubunda ortalama %50 oranında pozitiflik saptanmıştır; bu oran Kanada'da yaklaşık %40 iken Taiwan ve Panama'da %60'ın üzerinde bulunmuştur. Enfeksiyondan sonra antikorların ortalama 2 yılda kaybolması beklendiğinde *C. pneumoniae* antikor prevalansının %50 gibi yüksek bir oranda bulunması bir çok kişinin yaşamı boyunca birden fazla *C. pneumoniae* enfeksiyonu geçirdiğini düşündürmektedir. *C. pneumoniae* enfeksiyonlarının popülasyon insidansında bir periyodisite de vardır. Bu ABD'de 4 yıl, Danimarka'da ise 6 yılda bir belirgin piklet şeklinde gözlenmektedir. Bugüne kadar yapılan bütün çalışmalarda *C. pneumoniae* etkeninin en yaygın klinik manifestasyonlarının pnömoni ve sonra bronşit olduğu gözlenmiştir. Ayrıca değişen oranlarda diğer akut solunum yolu enfeksiyonları da bildirilmiştir. Araştırmalar yaşlılardaki *C. pneumoniae* enfeksiyonlarının genelde reinfeksiyon tipinde olduğunu göstermektedir. Japonya'da bildirilen bir olguda 18 günlük makrolid antibiyotik uygulamasını da kapsayan multiple antibiyotik kürlerine rağmen *C. pneumoniae* kültürlerde persistan olarak pozitif kalmıştır. Öte yandan birçok çalışmada nedeni bilinmeyen ateş ve influenza benzeri hastalık tablolarının *C. pneumoniae* enfeksiyonu ile ilgili olabileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir (68). İsviçre'de yapılan benzer çalışmada ise bu etkene rastlanmamıştır. Hastane dışında pnömoni geçiren kişilerin %10-21'inde serolojik olarak geçirilmiş *C. pneumoniae* enfeksiyonu saptanmıştır (1). Slovenya'da yapılan bir çalışmada *C. pneumoniae* varlığı %9,5 oranında bildirilmiştir. (69). İspanyada yapılan bir çalışmada ise *C. pneumoniae* IgM %13,5 oranında pozitif olarak bulunmuştur (67)

Atipik pnömonilerin yaklaşık %10-15'i *Legionella* türleri ile olmaktadır. Epidemiler ve endemiler yanında en sık sporadik olgulara rastlanır. Çeşitli çalışma serilerinde, toplumdan edinilmiş pnömonilerde *Legionella* türlerinin insidansı %1-30 arasında bildirilmiştir. Bu rakam, hastanede yatarak tedavi olmayı gerektirmeyen pnömonilerde %1 iken, hastane tedavisi gerektiren toplum kökenli pnömonilerde belirgin şekilde yükselmektedir. Nazokomiyal pnömonilerdeki *Legionella* insidansı % 1-30 arasında bildirilmiştir. Hastalığın insidansına ilişkin yapılan çalışmalarda alınan farklı sonuçlarda; bölgesel farklılıklar, hastanede yatma ya da ayaktan tedavi görme, tanı yöntemleri ve olanakları, çalışma yapıldığı sırada hastane veya toplumda epidemi oluşu ve altta yatan kronik hastalıkların sıklığı rol oynamaktadır. İleri yaşta olmak (>50), alkolizm, sigara içme, kronik bir hastalığı olmak (kronik bronşit, anfiyem, diyabetes mellitus, böbrek yetmezliği vs.), immüno-supresif durum ve transplantasyon uygulanması enfeksiyon riskini artıran faktörlerdir (1). Slovenya'da yapılan bir çalışmada *L. pneumophila* %2,8 oranında bildirilmiştir (69). İspanyada yapılan bir çalışmada *L. pneumophila* IgM %12,5 oranında pozitif olarak bulunmuştur (67)

Kesin rakamlar verilememekle birlikte ülkemizde de pnömoniler önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bugün tanı olanaklarında kaydedilen teknolojik gelişmelere rağmen pnömonilerin %49'lara varan büyük bir kısmında etyoloji saptanamamaktadır (68). Ülkemizde İstanbul Üniversitesinde yapılan bir çalışmada; *M. pneumoniae* %70,6 , *C. pneumoniae* %11,8 ve ikisi bir arada %11,8 oranında görüldüğü bildirilmiştir (70). Karadeniz Teknik Üniversitesinde yapılan bir çalışmada ise *M. pneumoniae* IgM %26,6 oranında pozitif bulunurken diğer atipik patojenlere rastlanmamıştır (71). İstanbul Üniversitesinde yapılan başka bir çalışmada *M. pneumoniae* %25,3 oranında saptanmıştır (72). Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinde yapılan bir çalışmada *M. pneumoniae* IgM %7,3 oranında

pozitif bulunmuştur (73). İstanbul Üniversitesinde yapılmış başka bir çalışmada da *C. pneumoniae* IgM %1,7, *C. pneumoniae* IgA %5,4 olarak bildirilmiştir (74).

Çalışmaya alınan toplam 78 hastanın 30'unun (%38,4) *C. pneumoniae* IgM, 36 hastanın (%46,1) *M. pneumoniae* IgM, 1 hastanın da (%1,2) *L. pneumophila* IgM IFA yöntemi ile pozitif bulundu. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışma sonuçlarında da olduğu gibi en çok *M. pneumoniae* pozitifliği saptandı. Çalışmamızın sonuçlarına göre *C. pneumoniae*'nin mevsimsel dağılışının kış ve bahar aylarında sık olmasını da göz önünde bulundurursak *C. pneumoniae*'nin kış ve bahar aylarında bölgemizde bir salgın oluşturmuş olduğunu söyleyebiliriz. Test grubu ile aynı tarihler arasında hastanemize başvuran bir kontrol grubu oluşturuldu. Test ve kontrol grubu sonuçları karşılaştırıldığında test grubunu pozitifliğinin kontrol grubuna göre istatistiki olarak yüksek olduğu görüldü. Kontrol grubundaki 28 örnekte, *C. pneumoniae* için bu oran %14,2, *M. pneumoniae* için %2,7 iken *L.pneumophila* için kontrol grubunda pozitiflik saptanmadı.

*C. pneumoniae*'sı pozitif olan hastalar, IgM ve IgA açısından değerlendirildiğinde, 30 hastanın (%38,4) IgM'i, 20 hastanın ise (%25,6) IgA'sının pozitif olduğunu saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda 32 hastada akut *C.pneumoniae* enfeksiyonu olduğu, 17 hastanın da *C. pneumoniae* enfeksiyonu geçirmiş olduğu saptandı. Test grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında genel sonuçlarda olduğu gibi test gruplarının kontrol gruplarına üstünlük sağladığı görüldü, IgM için bu oran 32/4 ve IgA için 17/1 olarak saptandı.

*M. pneumoniae*'sı pozitif olan hastalar, IgM ve IgA açısından değerlendirildiğinde, 36 hastanın (%46,1) IgM'i, 23 hastanın ise (%25,6) IgA'sının pozitif olduğunu saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda 36 hastada akut *M.pneumoniae* enfeksiyonu olduğu, 23 hastanın da *M.pneumoniae* enfeksiyonu geçirmiş olduğu saptandı. Test grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yine bu test gruplarının kontrol gruplarına üstünlük sağladığı görüldü. IgM için bu oran 36/1 ve IgA için 23/1 olarak saptandı.

Her iki etkenin de yüksek seropozitivite göstermesi, bölgemizde bu patojenlerin beklenenden daha yüksek oranda görülebileceğini işaret etmektedir. Dolayısı ile bu etkenlerin bir arada taranabildiği ve hasta bazında hızlı sonuç alınabilen IFA biyoçip slide panellerinin uygun bir tanı aracı olduğu ve maliyeti düşürdüğü düşünülmektedir.

Çalışmamızda, *C. pneumoniae* ve *M. pneumoniae*'nin beraber bulunduğu toplam 8 (%10,2) olgu saptandı. Bu hastaların çoğu 50 yaş ve üzerinde olup, hastanemize kış aylarında başvurmuş bulunuyorlardı. Bu hastalardaki seropozitiflik, ko-enfeksiyon ya da ardarda geçirilmiş pnömoni olarak değerlendirilebilir. *M.pneumoniae* ve *C.pneumoniae* pozitifliklerinin aylara göre dağılımı incelendi. *M.pneumoniae* kış aylarında en yüksek düzeye ulaşıp zamanla düzenli olarak azaldığı görüldü. *C.pneumoniae*, benzer bir grafik gösterirken baharda tekrar yükseldiği gözlemlendi. Bu durum bir salgına işaret etmektedir. *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* pozitiflikleri yaşlara göre de incelendi. Pozitiflik daha çok 40 yaş üzerinde görülürken, 50-60 yaşlarında sıklığının arttığı saptandı.

Hastaların balgam kültürü sonuçlarına baktığımızda; 12 hastada (%15,3) *S.pneumoniae*, 1 hastada (%1,2) *H.influenzae*, 1 hastada ise (%1,2) *Serratia odorifera* üredi. Hastaların 4'ünün ARB sonuçları pozitif olarak değerlendirildi. Hastaların serumlarından da atipik etkenlerin saptanmasıyla, hem bakteriyel pnömoni hem de atipik pnömoninin beraber görüldüğü olguların olduğu gözlemlendi.

Hastalar Influenza A ve B, RSV ve Adenovirus açısından da değerlendirildi. Hastaların 12'sinin (%15,3) Influenza A ile, 7'sinin (%8,9) Influenza B ile, 9'unun (%11,5) RSV ile ve 2'sinin de Adenovirus ile enfekte olduğu görüldü. Virusların mevsimlere ve yaşlara göre dağılımı

incelendiğinde; en çok kış ayları olmak üzere, bahar ve gz dönemlerinde yaygın olduğu görüldü. Bu viral patojenlerin atipik pnömoni etkenleriyle birlikteliğine de ratlanması ilgi çekicidir.

Hastaların tümü atipik pnömoni semptomları gösterirken, 19 hasta (%24,3) KOAH, 10 hasta (%12,8) astma, 2 hasta (%2,5) geçirilmiş pnömoni olgularına sahipti. Hastaların 34' (%43,5) ksrk, 32'si (%41) balgam çıkarma, 12'si (%15,3) gece terlemesi ve 6'sı da (%7,6) yan ağrısı Şikayetleri ile hastanemize başvurmuşlardı. Atipik pnömoni etkenlerinin; KOAH, astma gibi hastalıkların akut ataklarında hasta serumlarında pozitif bulunması, bu patojenlerin varlığının bu hastalıklarda düŐünülmesi gerektiğini göstermektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada da (75) KOAH akut atağında atipik pnömoni etkenlerinin saptandığı bildirilmiştir.

## 6. SONUÇ

Atipik pnömoni etkenlerinin saptanmasına yönelik olarak yaptığımız çalışmanın sonuçları ışığında, özellikle *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* 'nin bölgemizde görülen pnömonilerden sıklıkla sorumlu olabileceği söylenebilir. Bu etkenlerin mevsimsel dağılım olarak kış aylarında daha sık görüldüğü ve gösterdiği zamansal yoğunluklar göz önüne alındığında salgınlar halinde ortaya çıkabildiği de bulgularımızdan anlaşılmaktadır. Diğer bir etken olan *L. pneumophila*'nın düşük oranda bulunması, bu bakterinin rezervuar olarak bulunduğu havalandırma sistemleri gibi ortamlarda hastaların uzun süreli kalmamasına bağlı olabilir.

Diğer bir patojen grubunu oluşturan viral etkenlere de kış aylarında sıklıkla rastlanması ve bazen bakteriyel etkenlerle birliktelik göstermesi de ilginç bir sonuçtur. Yanısıra sporadik vakalarda birden fazla etkenin birarada saptanabileceği de gösterilmiştir. Dolayısıyla tüm patojen grupların taranmasının gerekliliği görülmektedir.

Çalışmada kullandığımız temel yöntem olan IFA'nın, hızlı ve güvenilir sonuç vermesi ve gerektiğinde bu tip infeksiyonlarda çeşitli patojenleri incelemeyi olanaklı kılması nedeniyle laboratuvarımızda rutin kullanıma uygun bir yöntem olabileceği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Atipik pnömoni etkenleri bölgemizde beklenenden daha fazla bulunmuştur.
2. Atipik pnömoni infeksiyonlarına yönelik rutin mikrobiyolojik incelemeler içinde yer almasının tanı ve tedavi açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.
3. KOAH, astma gibi altta kronik bir rahatsızlığın bulunması atipik pnömoni için bir zemin oluşturmaktadır.
4. Yeni bir yöntem olan biyoçip slide IFA paneli, ajanların tek tek araştırıldığı yöntemlere göre hızlı sonuç vermesi, pratik olması ve duyarlılığı ile iyi bir tanı yöntemidir.

Öneriler;

. Semptomatik hasta grubunda atipik pnömoni etkenleri, bölgemizde incelenmesi gereken bir patojen grubudur.

. Bu etkenlerin birarada araştırılmasında biyoçip slide IFA paneli pratik, ucuz ve duyarlı bir yöntem olarak kullanılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Arseven O. (1994). Atipik Pnömoniler ve Klinik . Klimik Derg ,7(3):117-119.
2. Ustaçelebi Ş. (ed) (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 365-584.
3. Davis B.D, Dulbecco R, Eisen H.N, Gindsberg H.S. (eds) (1990). Pneumococci, Microbiology (5<sup>th</sup> ed). Lippincott Company, Philadelphia. 515-24.
4. Falcham RR, Washington II AJ. (1991). *Streptococcus*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. (Eds). Manual of Clinical Microbiology. (5<sup>th</sup> ed). ASM Pres, Washihgton, D.C., 238-257.
5. Abigail A, Whitt S, Whitt DD. (eds) (1994). Streptococcal Sore Throat, Rheumatic Fever, and Glomerulonephritis, Bacterial Pathogenesis. ASM Pres Washington, DC, 332-38.
6. Joklik WK, Willet HP, Amos B, Wilfert CM.(eds) (1992). *S. pneumoniae*. Zinsser Microbiology. 20th ed. Prentice-Hall International Inc. Appleton-Lange, 432-442.
7. Musher D.M. (1995). *S. pneumoniae* In: Mandell, Dauglas, Bennet (eds), Principles and Practice Infectious Diseases (4<sup>th</sup>ed). Churchill Livingstone. New York, Edinburg, London, Melbourne, 1811-1825.

8. Bilgehan H. (ed). (2000). Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Barış Yayınları, İzmir.
9. Apicella M.A. (1995). *H. influenzae*. In: Mandell, Douglas, Bennett (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. (4<sup>th</sup> ed). Churchill Livingstone, New York, Edinburg, London, Melbourn, 1896-1908.
10. Bilgehan H. (ed) (1992). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Barış Yayınları, 254.
11. Cochi SL, Ward JI. (1991). *H. influenzae* type B. In: Evans and Brachman (eds). Bacterial Infections of Human-Epidemiology and Control. Plenum Medical Book Company, New York, London, 277-351.
12. Farley MM, Stephens DS, Brachman PS, Harvey RC, Smith JD, Wenger JD. (eds) (1992). Invasive *H. influenzae* disease in adults. Ann Intern Med, 116:806-812.
13. Morello A.J, Janda W.M, Doern G.V. (1991). *Neisseria* and *Branhamella*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. (Eds). Manual of Clinical Microbiology. (5<sup>th</sup> ed). ASM Pres, Washihgton, D.C., 258-276.
14. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schrechkenberger PC, Winn WC Jr. (eds) (1997). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. (5<sup>th</sup> Brooks GF, Butel JS, Morse SA. (eds). (1998). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. Appleton and Lange, Connecticut, Stamford.
15. Baron E.J, Finegold S.M. (eds) (1990). Non fermentative Gram- Negative Bacilli and Cocobacilli, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology (8<sup>th</sup> ed). The C.V. Mosby Company, Toronto, 386-407.
16. Grayston JT. (ed). (1989). *C. pneumoniae*, strain TWAR. Chest 1989; 95:664-669.
17. Saikku P, Wang SP, Kleemola M, Brander E, Rusanen E, Grayston JT. ,et al. (1985). An endemic of mild pneumoniae due to an unusual strain of *C. psittaci*. J Infect Dis ;151:832-39.



18. Grayston JT. (1995). *C. pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas, and Bennets's Principles and Practise of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia. 1696-1700.
19. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. (eds). (1998). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. Appleton and Lange, Connecticut, Stamford.
20. Ustaçelebi Ş. (1997). Bacteriology and Molecular Biology of *Chlamydia*. In:Fems Workshop Human Chlamydial Infections. Serter D, Erten E, Dereli D. (eds). Fems and Ege University. İzmir.9-23.
21. Grayston JT. (ed). (1989). *C. pneumoniae*, strain TWAR. Chest 1989; 95:664-669.
22. Airene S. (1999). *C. pneumoniae* infection in human monocytes. Infect Immun, 67: 1445-1449.
23. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. (eds) (1997). *Neisseria sp.* and *Moraxella catarrhalis*, Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. (5<sup>th</sup> ed). Lippincott Raven, Philedelphia, 491-537.
24. Gencay M. (1997). Diagnosis of Chlamydial Infections by Micro immuno flourescence (MIF) Test. In: Fems Workshop Human Chlamydial Infections. Serter D, Erten E, Dereli D. (eds). Fems and Ege University, İzmir :74-78.
25. Ağaçfıdan A. (1994). Atipik Pnömoni Etkeni *Chlamydia* Cinsinden Mikroorganizmaların Laboratuar Tanısı. Klimik Derg, 7(3):120-122.
26. Ekman M.R, Grayston JT, Visakopri R, Kleemola M, Kuo C.C, Saikku P. (1993). An epidemic of infections due to *C. pneumoniae* in military conscripts. Clin Infect Dis, 17:420-425.
27. Pruckler JM, Masse N, Stevens VA, et al. (1999). Optimizing culture of *C. pneumoniae* by using multiple centrifugations. J Clin Microbiol, 37:3399-3401.
28. Gaydos CA, Fowler CL, Gill VJ, Eiden JJ. (1993). Detection of *C. pneumoniae* by PCR enzyme immunoassay in an immunocomposed population. Clin Infect Dis, 17:718-723

29. Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet MI, et al. (1999). Prospective study of community- acquired pneumonia of bacterial etiology in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18:852-858.
30. Grayston JT, Diwan VK, Cooney M, Wang S-P. Community and hospital-acquired pneumonia associated with Chlamydia TWAR infection demonstrated serologically. *Arch Intern Med* 1989; 149:169-173.
31. Grayston JT, Aldous MB, Eatson A, et al. (1993). Evidence that *C. pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. *J Infect Dis*, 168:1231-1235.
32. Kuo C.C, Grayston JT. (1988). Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia sp.* strain TWAR. *J Clin Microbiol*, 157:230-236.
33. Ekim N, Köktürk O, Arseven O ve ark. Toplum Kökenli Pnömoni: Tanı ve Tedavi Rehberi. *Klimik Derg.* 1998;11(Özel Sayı):4.
34. Kenny E.G. (1991). Mycoplasmas. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. (5<sup>th</sup> ed). ASM Pres, Washihgton, 478-82.
35. Baron E.J, Finegold S.M. (1990). Chlamydia, Mycoplasma, and rickettsia, Bailey and Scott's *Diagnostic Microbiology* (8<sup>th</sup> ed). The C.V. Mosby Company, Toronto, 558-71.
36. Baum SG. (1995). *M. pneumoniae* and atypical pneumonia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice Infectious Diseases*. (4<sup>th</sup> ed). New York:Churchill Livingstone, 1704-1712.
37. File TM, Tan JS, Plouffe JF. (1998). The role of atypical pathogens: *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *L. pneumophila* in respiratory infection. *Infectious Diseases Clinics of North america*. W.B. Saunders Comp. Philedelphia, 569-92.
38. Eraksoy H. (1996). Mikoplazma pnömonileri. In: Topçu A, Söyletir G, Doğanay M(eds). *İnfeksiyon Hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevleri; İstanbul, 379.
39. Austrian R. (1990) *Pneumococci*. Davis B.D,Dulbecco R, Eisen H.N, Gindsberg H.S. (eds). *Microbiology* (5<sup>th</sup> ed). Lippincott Company, Philadelphia, 712-13

40. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. (eds) (1997). *Mycoplasmas and Ureaplasmas, Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. (5<sup>th</sup> ed)* Lippincott Raven, Philadelphia, 857-92.
41. Cimolai N, Cheong A. (1996). An assessment of a new diagnostic indirect enzym immunoassay for the detection of anti-*mycoplasma pneumoniae* IgM. *Am J Clin Pathol* 105:205-9.
42. Pınar A. (2002). Doğa Kaynaklı İnsan Patojeni *Legionella*; Tanı ve Korunma Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2): 93-98.
43. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (eds) (2002). *Legionella, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi,393-96.
44. Rodgers FD, Pasculle A.W. (1991). *Legionella*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shodomy HJ. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology (5<sup>th</sup> ed)*. ASM Pres, Washihgton, D.C., 442-46.
45. Abigail A, Whitt S, Whitt DD. (eds) (1994). *Legionnaire's Disease, Bacterial Pathogenesis*.ASM Pres Washington, DC, 301-5
46. Akbaş E. (1996). *Legionellacea: İntraselüler paraztizm*. *Mikrobiyol bült.* (3);30:313-22.
47. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. (eds) (1997). *Legionella, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology( 5<sup>th</sup> ed)*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 473-89.
48. Blatt SP, Parkinson MD, Page E, et al.(1993). Nasocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease: aspiration as aprimary mode of disease acqusition. *Amer J Med*, 95:16-22.
49. Rodgers FD, Pasculle A.W. (1991). *Legionella*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shodomy HJ. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology (5<sup>th</sup> ed)*. ASM Pres, Washihgton, D.C., 449.
50. Lisby G, Dessau R. (1994). Construction of DNA amplification assay for detection of *Legionella sp.* in clinical samples. *Eur J Microbiyol Infect Dis*, 13(3):225-31.
51. Gedikoğlu S. (ed). *Tüberküloz Bakteriyolojisi ve Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri*. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D, 4-24

52. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. (eds) (1997). *Mycobacteria*, Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. (5<sup>th</sup> ed) Lippincott Raven, Philadelphia, 893-952.
53. Durupınar B, Günaydın M. (1997). Tüberküloz Tanısında Auramine-Rhadomine Boyama Yönteminin Güvenirliği Mikrobiyoloji Bülteni. 31 :369-374.
54. Bilgehan H. (ed) (1992). Mycobacteriumlar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 516-32
55. Journal of Clinical Microbiology 1999: 3711-3712.
56. Roggenkamp A, Hornef MW, Masch A, Aigger B, Autenrieth IB, Haesemann J. (2000). Comparison of MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. J Clin Microbiol. (8)38:3133-4.
57. Anğ Ö, Uzun M, Erturan Z. (1998). Dünyada ve Türkiye’de Tüberküloz. Klimik Dergisi, 2:3-5.
58. Barış İ. (1996). Son Bilgiler Işığında Tüberküloz İnfeksiyon Bülteni. 1:28.
59. Ustaçelebi Ş. (1996) İnfluenza viruslarının kontrolü ve epidemiyolojisi. In:Bozkaya E, Yılmaz G, Badur S. (eds) Klinik viroloji ve viral infeksiyonların laboratuvar tanısı. Türk mikrobiyoloji cemiyeti yayınları, İstanbul.
60. Howard B.J. (ed) (1987). Paramyxoviruses, Clinical and Pathogenic Microbiology (2<sup>nd</sup> ed). George Washington University Medical Center, Washington, 813-18.
61. Hall CB. (1983) The nasocomial spread of respiratory syncytial viral infections. Annu Rev Med, 34:311-9.
62. Englund JA, Sullivan CJ, Jordan C. et al. (1988). Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. Ann Intern Med., 109:203-8.
63. Heilman C, La Montagne JR. (1990). Influenza: status and prospects for its prevention, therapy, and control. Pediatr Clin North Am., 37(3):669-88, 161:402-6.

64. Yenen O.Ş. (1996). Virolojide Çabuk Tanı Testleri. In: Bozkaya E, Yılmaz G, Badur S. Klinik Viroloji ve Viral İnfeksiyonların Laboratuar Tanısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul, 25-31.
65. Manresa F, Dorca J. (eds) (1994). *Mycoplasma, Coxiella* and Chlamydial Infection. Current Opinion in Infectious Diseases, 7:173-177. Spain
66. Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR et al. (1994). Diagnostic Utility of PCR-Enzyme Immunoassay, Culture, and Serology for Detection of *Chlamydia pneumoniae* in Symptomatic and Asymptomatic Patients. *J of Clin Microbiol* 32(4):903-905.
67. Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML. et al. (1999). Prospective study of community-acquired pneumoniae of bacterial etiology in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 118(12):847-51.
68. Akbaş E, Rota S. (1993). solunum Yolu İnfeksiyonlarında Yeni Bir Patojen: *C. pneumoniae*. *Klimik Derg* , 6(2):51-53.
69. Socan M, Marinic-Fischer N, Kraigher A, Logar M. (1999). Microbial aetiology of community-acquired pneumoniae in hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 18(11):777-82
70. Erelel M, Aydın D, Kıyan E, Çuhadaroğlu Ç, Arseven O, Tabak L. (2000). Atipik Pnömoni ve Dual Etiyoloji. *Klimik Derg*, 13(2):46-49.
71. Özlü T, Bülbül Y, Kaygusuz S, Öztuna F, Yıldırım Z, Köksal İ. (2000). Toplum Kökenli Pnömoni Olgularımızda *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* ve *L. pneumophila* Sıklığı. *Solunum Hastalıkları* ,11:135-139.
72. Aydın M.D, Yılmaz G, Türkoğlu S. et al. (1996). Atipik Pnömonili Hastalarda *M. pneumoniae* İnfeksiyonunun Kültür, Seroloji ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması. *Klimik Derg*, 9(3):127-130.
73. Aktepe OC, Akbaş E, Beder S ve ark. (1995). Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu S(ASYE) Etkeni Olarak *C. pneumoniae* .1. Ulusal *Chlamydia* enfeksiyonları. Simpozyumu Bildirileri.İstanbul, 82.
74. Ağaçfıdan A. (1997). Chlamydial Infections in Turkey .In: Fems Workshop Human Chlamydial Infections. Serter D, Erten E, Dereli D. (eds). Fems and Ege University. İzmir.51-54.

75. Uzun K, Özbay B, Buzgan T. Et al. (2002). KOAH Akut Atağında *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. spp.* Ve Influenza A sıklığı. Toraks Dergisi, 3(2):146-149.



