

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ENSTİTÜSÜ

5-15 YAŞ ARASI ÇOCUKLARDA
MYCOPLASMA PNEUMONIAE PNÖMONİLERİNİN
SEROLOJİK TANISI

Pediyatrik Enfeksiyon
Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof.Dr.S.Ölker ÖNEŞ
Hazırlayan: Uzm.Dr.Tülay GÜLÇİN YARDIMCI

İstanbul-1993

31459.

Tezimin hazırlanmasında değerli yardımlarını gördüğüm İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve İ.U.Çocuk Sağlığı Enstitüsü Başkanı Sayın Prof.Dr.Olcay NEYZİ'ye,

Tez konumun seçilmesi, planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde çok değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr.Ulker ÖNEŞ'e,

Saygı ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Uz.Dr.Tülay Gülçin YARDINCI

YÜCEKÖĞRETİM KURULU
KURUMUNCA

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	
TARİHÇE	3
KLASİFİKASYON	4
MYCOPLASMA PNEUMONIAE	
● Morfoloji	5
● Motilite ve Çoğalma	5
● Yapı	5
● Büyüme ve Fiziksel Özellikler	6
● Antijenik Yapı	7
MYCOPLASMA PNEUMONIAE PNÖMONİSİ	
● Epidemiyoloji	8
● İnkübasyon Periyodu ve Bulaşıcılık	8
● Cinsiyet	9
● Patogenez	9
● Patoloji	10
● Hastalık Oluşumu Mekanizması	11
● Klinik Bulgular	12
● Tanı	13
● Ayırıcı Tanı	17
● Tedavi	18
● Aşılama	19
MATERYAL VE METOD	
YÖNTEM	20
BULGULAR	
Tablo 2 (OLGULAR)	27
TARTIŞMA	33
SONUÇLAR	38
ÖZET	39
KAYNAKLAR	40

GİRİŞ

Mycoplasma pneumoniae pnömonisi halk arasında sık görülen primer olarak çocuk ve genç erişkinleri tutan bir enfeksiyon hastalığıdır (6).

Solunum yollarında *M.pneumoniae* içeren tüm hastaların sadece % 3-10'unun pnömoni tablosu gösterdiği tahmin edilmesine rağmen, genel popülasyonda tüm pnömonilerin %30 kadarının *M.pneumoniae* etkeni tarafından oluştuğu bilinmektedir. Kapalı toplumlarda tüm pnömoni vakalarının yaklaşık yarısının etkeni *M.pneumoniae* olabilmektedir. Aile içinde çocuklar arasında ise enfeksiyon hızı % 81'e kadar çıkabilmektedir (7).

Tüm dünyada özellikle çocukluk döneminde saptanan pnömonilerde *M.pneumoniae* etkeninin prevalansı yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır. Ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışma saptanamamıştır. Bu konuda bir pilot çalışma ile etkeni saptanamamış pnömonilerin değerlendirilmesinin yararlı olacağını düşündük.

Araştırmamızda 5-15 yaş arasında pnömoni tanısı konulmuş, ancak rutin yöntemler ile etkeni belirlenememiş ve kliniğimizce enterne edilmiş vakaları fizik muayene, laboratuvar ve özel serolojik testler ile değerlendirmeyi planladık.

Vaka sayımızın az olmasına rağmen çalışmamızın ileride yapılacak çok merkezli epidemiyolojik çalışmalara yol gösterebileceğini düşündük. Bu amaçla böyle vakalarda M.pneumoniae'ya konvelesan dönemde tanı koyduran spesifik IgM ve IgG antikor yükselmesini erken, hızlı ve kolay bir şekilde tanıyabilecek, uygun tedaviye zamanında yönlendirmeyi sağlayacak, özel bir test olan Latex Aglütinasyon testini uyguladık.



GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

Doğada bulunan en küçük serbest yaşayan mikroorganizmalardan Mycoplasmalar, insan da dahil olmak üzere birçok hayvandan 50 türden fazla izole edilmiştir (1). Bunlardan Mycoplasma pneumoniae'nın da içinde bulunduğu 11 tür ise hastalık etkeni olarak saptanmıştır.

Jenerik ad olarak Mycoplasma, Yunanca ve Latince kökenli olup "myco" miçelyal yapıyı, "plasma" ise organizmanın plastisite ve pleomorfizmini karakterize etmektedir.

1898'de Nocard ve Roux ilk Mycoplasma türlerini bulaşıcı plöro-pnömonisi olan sığırlardan elde etmişlerdir. Bu orijinal buluşu takiben birçok mycoplasma türleri diğer hayvanlardan da izole edilmiştir. Genellikle hastalık etkeni olmayan bu türler "pleuropneumoniae like organisms = PPLo" olarak 1960'lara kadar adlandırılmışlardır (2).

Mycoplasmaların insandan ilk kez izole edilmesi 1937 yılında Dienes ve Edsall tarafından yayınlanmıştır. 1944 yılında ise Eaton ve arkadaşları "Eaton ajanı" olarak adlandırılan ve primer atipik pnömonisi olan hastalardan izole edilen bir etken tanımlamışlardır (3). Eaton ajanı streptomisin ve klortetrasiklin ile inhibe edilmesine rağmen yıllarca bir virüs olarak kabul edilmiştir. 1961'de Marmion ve Goodburn'ün Eaton ajanı ve "pleuropneumoniae like organisms = PPLo" nun morfolojik olarak benzerliğini vurgulamasından sonra 1962 yılında bugün M.pneumoniae olarak bilinen mikroorganizma "cell-free" hücreden yoksun agar ortamında kültüre edilerek ve gönüllü insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda primer atipik pnömoninin etkeni olarak belirlenmiştir.

KLASİFİKASYON

Mycoplasmataceae ailesine bağlı bir cins olan Mycoplasmalar aynı zamanda Mycoplasmatales takımı ve Mollicutes sınıfında yer alırlar (4). Sitoplazmalarında lokalize olarak NADH oksidaz içeren mycoplasmalar, büyüme için sterole gereksinim duyarken, moleküler ağırlığı yaklaşık 5.0×10^8 dalton olan bir genoma sahiptir.

Mollicutes sınıfındaki tüm diğer organizmalar gibi Mycoplasmalarda da hücre duvarı bulunmaz ve üreyi hidrolize etmezler (5). Mycoplasmalar insanda solunum yolları dışında genitoüriner yollarda izole edilmişlerdir. Solunum yollarında sıklık sırasına göre izole edilen Mycoplasmalar şunlardır:

- 1- M.salivarium
- 2- M. orale
- 3- M.pneumoniae
- 4- M.buccale
- 5- M.faucium
- 6- M.lipophilum

Bunlardan M.salivarium ve M. orale genelde normal respiratuvar floranın bir parçası olup, hastalık oluşturmazlar. M.buccale, M.faucium, M.lipophilum nadiren izole edilen organizmalar olup şu anda insanda hastalık etkeni olarak değerlendirilmemektedir (1). M.pneumoniae ise özellikle respiratuvar hastalıkların en sık etkenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

● Morfoloji

Mycoplasmalar hücre duvarı içermedikleri için pleomorfik yapıdadırlar. Ultrastrüktürleri basit olan Mycoplasmalar rölatif olarak temel bir yapıda hücre membranı ve sitoplazma içerirler (4). M.pneumoniae'nın ultrastrüktürünü Hamster trakeal organ kültüründe çalışan Wilson ve Collier adlı araştırmacılar, trilaminar membranlı filamentöz organizmalar gözlemlədiler. Bu hücrelerin her biri pleomorfizmin yanısıra spesialize terminal yapılarla organ kültürüne bağlanmışlardı. Bu terminal yapı santral filamanları daha yoğun olan bir nüveye sahipti. Organizma ve organ kültürü arasında füzyonu gösterememekle beraber iki yüzey arasında gevşek fibril ağını belirlediler (8). Organizma hücre yapısında her biri nükleik asit içeren fibriler materyaller ve sitoplazmik granülleri gösterdiler.

● Motilite ve Çoğalma

Bredt adlı araştırmacı cam bir yüzeyde sıvı bir ortamda faz kontrast mikroskopisi ile M.pneumoniae motilitesini ve çoğalmasını incelerken, organizmanın "binary fission" ile çoğaldığını, önce kısa filamentöz yapıların oluştuğunu ve daha sonra hücrenin ikiye bölündüğünü gözlemledi. İki bölünme arasında hücre üç saatlik bir büyüme evresi geçirmekte ve hareketliliğini kayma şeklinde sağlamaktadır. (9).

● Yapı

Mycoplasmalar %40-60 oranında protein, %10-20 oranında lipid ve değişen oranlarda karbonhidrat içerirler. Genomları çift sarmal DNA olup 4.8×10^8 dalton kontur uzunluğundadır (10).

● Büyüme ve Fiziksel Özellikler

M.pneumoniae hayvan serumu, maya ekstraktı ve buyon ortamında üretilebilir. Büyüme için sterole gereksinimi olan organizma karbonhidratları fermente ederken hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda büyüyebilir. Azota ve %5 karbondioksitde inkübe edilirse büyüme daha belirgindir. İnsandan izole edilen diğer mycoplasmalarla karşılaştırıldığında büyümesi daha yavaştır. Bu, gözle izlenebilir koloni oluşumunu ilk bir hafta içinde engeller. Koloni oluşumu için en az üç haftaya gereksinimleri vardır. Tekrarlanan agar pasajları organizmanın büyümesini kolaylaştırırken, laboratuvarında üç günde kolonizasyonu sağlar. Agar kolonilerinin görüntüsü klasik tavada yumurta "fried egg" görüntüsüne sahip diğer mycoplasmalardan farklı olup sferik ve kaba pürüklü bir yüzeye sahiptir.

M.pneumoniae NADH₂ oksidaz, NADPH₂ oksidaz, laktik dehidrogenaz, süksinik dehidrogenaz ve diaforaz içerir. Sıvı ortamda glikoz ve fenol kırmızısı eklenerek, glikoz metabolizmasına bağlı renk değişimi metilen mavisinin redüksiyonu dehidrogenaz aktivitesini, 2-3-5 tetrazolyum kloridin kırmızı formazana redüksiyonu da dehidrogenaz aktivitesini gösterir (11).

Peroksit salınımına bağlı olarak agar ortamlarda eritrositleri hemolize eder. Eritrosit ve diğer hücrelerin mycoplasma kolonilerine adsorbe olmaları sonucu karışım halindeki organizma hemagglütinasyon oluşturabilir. Isıya oldukça hassasiyet gösteren mycoplasmalar 50 derece santigratta iki dakikadan az yarı ömür gösterirken bir haftada oda ısısında yaşam fonksiyonlarını yitirir. -20°C'de yıllarca saklanabilirse de -70°C'de uzun süreli saklama için optimal ısı sağlanabilir (12).

Ozmotik çevresel değişikliklere dayanıklı olan mycoplasmalar deterjanlara karşı dayanıksızdırlar. Altın

tuzları ve hücre duvarını hedef almayan antibiyotiklerle inhibe olurlar.

● Antijenik Yapı

Spesifik kompleman fiksasyonu, jelde presipitasyon, büyümenin inhibisyonu, indirekt hemagglütinasyon, metabolik inhibisyon, antijen-antikor kompleksinin immünofloresansı, ELISA (Enzyme linked immüno sorbent assay), radioimmünoassay, aderans inhibisyonu, nonspesifik kompleman fiksasyonu (+ serolojik sifiliz testleri) ve agglütinasyon (soğuk ve streptokok MG agglütininleri) yöntemleriyle idantifiye edilebilir (13).

Mycoplasma pneumoniae'nin diğer bir önemli antijeni PI proteindir (14). Terminal organelin yüzeyinde lokalize olan bu protein yapışmada ve hücrenin kayma hareketinde görev üstlenir. PI proteinine karşı oluşan antikorlar hemadsorpsiyonu ve respiratuvar epitele aderansı inhibe ederler (15).

M.pneumoniae'nin membran determinantları I antijeni içeren eritrosit glikoproteini ile pnömokok serotip 23 ve 32, ıspanak, havuç glikolipidleri, grup A streptokok, seçilmiş *Stafilakokus aureus* tipleriyle çapraz reaksiyon verirler (16).

M.pneumoniae insandan başka Hamster ve farede pnömoni etkeni olabilirken, tavuk embriyosunun bronşiyal epitelinde belirsiz enfeksiyon etkenidir.

MYCOPLASMA PNEUMONIAE PNÖMONİSİ

● Epidemiyoloji

Büyük şehirsal alanlarda M.pneumoniae endemik olarak görülür ve enfeksiyon tüm yıl boyunca herhangi bir dönemde görülebilir. Foy ve arkadaşları Seattle'da yaptıkları bir araştırmada enfeksiyonu iki yıllık bir sürede incelemişler ve mevsimlere ait bir değişiklik bulamamışlardır (17). Bu endemik paternin yanısıra M.pneumoniae belirli bir yörede sıklık bir epidemik yapı gösterme eğilimindedir. Epidemiler 3 ile 7 yıllık aralarla oluşur (18). Yavaş gelişen epidemiler sonbaharda başlar ve o yörede 12-30 ay kadar etkinliğini sürdürür.

● İnkübasyon Periyodu ve Bulaşıcılık

M.pneumoniae'nın inkübasyon periyodu çeşitli çalışmalarda ortalama olarak bir hafta ile üç hafta arasında değişmektedir.

Diğer solunumsal hastalıklardan (kızamık ve influenza gibi) farklı olarak kışla ve yatılı okul gibi kapalı ve açık toplumlarda hastalığın yayılımı nispeten yavaştır. Aile içinde yayılımı indeks olgu ile ilişkiden çok pasajlar şeklinde olmaktadır. Foy ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada aile içi sekonder atak hızını çocuklarda %64, yetişkinlerde %17 olarak bulmuşlardır (19).

Aile içi yayılım genellikle akut fazda gerçekleşirken, asemptomatik kişilerin enfeksiyonun yayılmasına katkı gösterdiği gösterilmiştir (20).

Bütün bu bilgilerin ışığı altında M.pneumoniae enfeksiyonları dünyanın dört bucağında kutuplardan tropikal kuşağa kadar çeşitli coğrafi bölgelerde sıklıkla rastlanabilen bir enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (21).

● Cinsiyet

Çeşitli çalışmalarda oranlar değişmesine rağmen M.pneumoniae'ya bağlı hastalık insidansında cinsiyete göre farklılık azdır. Foy ve arkadaşları Seatte'da 11 yıllık bir çalışma sonucunda hastalık insidansını kadınlarda erkeklerden fazla bulurken, süt çocukluğu döneminde erkek çocukların kız çocuklardan daha yüksek bir insidans gösterdiğini diğer yaşlardaki çocuklarda ise cinsiyete bağlı bir farklılık olmadığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda semptomatoloji açısından ele alındığında erkek çocuklarda daha ciddi bir semptomatoloji dik-kati çekmektedir.

● Patogenez

M.pneumoniae enfeksiyonu solunum yoluyla enfekte olmuş hasta kişilerin solunumsal sekresyonlarıyla bulaşır. Yayılma aerosol şeklinde küçük partiküllerle olabildiği gibi nazofarinksin ve belki alt solunum yolları epitelyal yüzeyiyle temas eden droplet sekresyonlarıyla da olabilir.

Etkenin çoğalması muköz membranların ekstrasellüler yüzeyinde olmaktadır. İnkübasyon süresi dört gün ile üç hafta arasında değişir. Bu süre muhtemelen orijinal inkübasyondaki boyutlara bağlıdır. İnkübasyon süresi sırasında enfeksiyonun boyutları gelişir ve respiratuvar sekresyonlarda gizlenen organizma, klinik hastalık oluşmadan iki ile sekiz gün önce gözlenebilir (22). Klinikte ilk belirti olarak baş ağrısı, halsizlik, ateş, boğaz ağrısı ve öksürük görülebilir. Bunları takip eden üç gün içerisinde enfeksiyon alt solunum yollarına ait semptomları vermeye başlar. (23).

Klinik semptomlar oluştuğundan sonra solunum yolu sekresyonlarında yüksek oranlara ulaşan mycoplasmalar

bir hafta süreyle maksimum düzeyde kalırken bunu takip eden altı hafta boyunca sekresyonlarda bulunur. Daha sonra menenjit, artrit, hemolitik anemi, kızarıklık, perikardit gibi komplikasyonlar etkenin sürekli olarak solunum yollarından dissemine olduğunu gösterir. Yapılan klinik çalışmalar etkenin multisistem tutulumundan çok solunum yollarında neden olduğu immünolojik reaksiyonlara bağlı etki gösterdiği yolundadır. Ancak yayınlar bu konuda yeterli bilgiyi sağlayacak düzeyde değildir.

Bazı izole olgularda etken mikroorganizma kan, perikardiyal sıvı, böbrek, beyin ve serebrospinal sıvıdan elde edilmiştir. Ek olarak *M.pneumoniae* meningoensefalitlerinde görülen düşük serebrospinal sıvı glikoz düzeyi organizmanın direkt katılımını düşündürmektedir (24).

● Patoloji

M.pneumoniae'nin neden olduğu hastalıkta çocuklardaki patolojik bulgular yayınlanmamıştır. Erişkinlerde olan değişikliklerle ilgili de çok az veri vardır. Ancak hamster, trakeal organ kültürleri, postmortem materyal ve insan biyopsilerinden elde edilen bazı veriler mevcuttur.

M.pneumoniae'nin neden olduğu primer zarar solunum yollarındaki epitelyal mukoza tabakasıdır. Bu zarar bronş, bronşiol ve alveollerin yüzeyinde tespit edilebilir. Çocuklardaki klinik semptomatoloji benzer patolojik değişikliklerin trakea ve üst solunum yollarında da oluştuğunu göstermektedir. Bronş ve bronşiolde silier epitelin destrüksiyonu tipiktir. Lümen mukozal deskuamasyon ve ülserasyona bağlı debride iken fibrin, mononükleer hücreler ve nötrofil içeren enflamatuvar eksüda ile de doludur. Alveoler alanlarda benzer eksüda ve ödem sıvısı ile doludur. Daha sonra bu infiltrata makro-

fajlar, lenfositler ve plazma hücreleri katılır. Septal kapillerlerin dilatasyonu, interstisyel alanlara taşan infiltrat birikimi görülebilir. Makroskopik olarak akciğerler hemoraji ve konjesyon alanları gösterirler. Plevrada fibrinöz eksüda toplanabilir.

Biyopsi örneklerinde vezikülopüstüleri deri lezyonları belirgin intrasellüler ödemli akantozis gösteren bir epidermis sergiler. Üst koryum ve epidermiste hemorajik alanlar, papiller ve üst retiküler dermiste nötrofil ve yuvarlak hücreler görülebilir.

Diğer organ bulguları mezenterik lenfadenit, fokal hepatik nekroz, foliküler splenit, akut miyokardit ve hemorajik ensefalit şeklinde olabilirse de klinikte görülme oranı düşüktür.

● Hastalık Oluşumu Mekanizması

Olası bir mekanizma, organizmanın hücre ile yakın teması ve bağlanmasıyla hücrede nöraminik asit reseptörlerinin utilizasyonu ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu yakın bağlanma hücreyi denatüre edecek hidrojen peroksit salınımına bağlanan bir değişime neden olmaktadır. In vitro yapılan çalışmalarda hidrojen peroksidin hücre düzeyinde yıkıcı etkiye sahip olduğu organ kültürlerinde gösterilmiştir.

Hücre kültürlerinde *M.pneumoniae* konak hücrenin katalaz aktivitesini inhibe eder. Bu inhibisyon mikroorganizma tarafından üretilen hidrojen peroksidin toksisitesini arttırır.

● Klinik Bulgular

M.pneumoniae klinikte karşımıza çeşitli tablolarla çıkabilir: Respiratuvar bulgular pnömoni ve pnömoni dışı üst solunum yolu enfeksiyonları, faranjit ve nazofaranjit, otitis media ve böllöz hemorajik mirenjit krup, bronşiolit ve enfeksiyöz astım olabilir. Respiratuvar bulgular dışında kardiyak, hematolojik, gastrointestinal, nörolojik, dermatolojik komplikasyonlar da görülebilir.

● Pnömoni

Pnömoni M.pneumoniae enfeksiyonlarının en önemli klinik bulgularından biridir. M.pneumoniae tüm pnömoni vakalarının %10-20'sinden sorumlu olan ajandır. En yüksek insidans 5-14 yaş arası çocuklarda görülmektedir.

● Semptom ve Bulgular

M.pneumoniae pnömonisinde ana bulgular ateş ve öksürüktür. Hastalığın başlangıcı genellikle kolay fark edilemez. Ancak halsizlik, ateş, baş ağrısı gibi nonspesifik semptomlar erken dönemde görülür. Öksürük hastalığın başlangıcından 3-5 gün sonra başlar ve önceleri nonprodüktif bir karakteri vardır. Araştırmacılar yapılan çalışmalarda %77-100 oranında maksimal vücut ısısını 38.9°C'dan büyük bulmuşlardır. 40.6°C'ın üzerine çıkan bir ateş M.pneumoniae için nadirdir.

Baş ağrısı bulgusu çeşitli araştırmalarda değişik oranlarda ifade edilmiştir. Uşüme hissi ve balgam oluşumu hastalığın ilerleyen dönemlerinde görülebilmektedir. Aşağıdaki tablo M.pneumoniae pnömonisi olan erişkin ve çocuklarda klinik bulguların sıklığını göstermektedir (1):

Tablo 1. M.pneumoniae pnömonili erişkin ve çocuklarda klinik bulguların sıklığı (1)

Semptom	Sıklık	Semptom	Sıklık
Ateş	++++	Diyare	+
Öksürük	++++	Bulantı,kusma..	+
Halsizlik	+++	Göğüs ağrısı ..	+
Baş ağrısı	++	Raller	+++
Balgam	++	Faranjit	++
Titreme	++	Lenfadenopati..	+
Ses kısıklığı ...	+	Konjunktivit...	±
Nezle	+	Döküntü	±
Boğaz ağrısı	+	Otitis media...	±

Nezle çocuklarda daha sık görülen bir semptom iken, prodüktif öksürük erişkinlerde daha sıktır.

TANI

● İmmünoloji

A) **Spesifik antikor:** M.pneumoniae enfeksiyonlarından sonra immünofloresans, kompleman fiksasyon, indirekt hemagglütinasyon, presipitasyon, growth inhibisyon, mycoplasmasidal antikor testi, ELISA, radioimmunoassay, adherans inhibisyonu ve radioimmunoassay ile birlikte radioimmuno-presipitasyon testlerine karşı spesifik bir serum antikor cevabı oluşur (11).

Kompleman fikse eden antikorlar en erken oluşurlar ve bir ay içerisinde maksimum değerlerine ulaşırlar. Daha sonra değişken bir zaman periyodu içerisinde azalır. Floresans boyalı antikorlar ve ELISA kompleman fikse eden antikorlara benzer bir yapı taşırlar. Büyümeyi inhibe eden antikorlar hastalığın başlangıcından iki ile

üç hafta sonra görülmeye başlar. Maksimum düzeye çok sonraları erişirken kompleman fikse eden antikörlerden daha uzun süreli kalırlar. Başlangıç serum immun cevabı spesifik IgM, IgG ve IgA antikörleridir. Klinik hastalık ve konvelasans döneminden sonra spesifik antikor başlıca serumun IgG fraksiyonunda yer alır. IgM'nin anlamlı düzeyleri aylarca veya enfeksiyon sonrası yıllarca da tespit edilebilir. Enfekte çocuklarda antikor cevap titreleri erişkinlerden düşük düzeyde kalır (11,25).

Çocuklarda görülen asemptomatik enfeksiyonlarda ölçülebilir serum antikor cevabı oluşmayabilir. Astımlı ve/veya atopik dermatitli hastaların serumlarında M.pneumoniae spesifik IgE antikörleri gözlenmiştir(26). Enfeksiyonu takiben spesifik antikörler nazal sekresyonlar ve tükürükte bulunur (25).

B) Spesifik Hücresel İmmünite: Yaşa bağlı çalışmalarda, daha önce enfeksiyon geçirdiği saptanmış dört yaşın altındaki 9 çocuktan sadece 1'inde spesifik hücresel immünite bulguları lenfosit stimülasyonu ile gösterilebilmiştir. Buna karşı olarak dört yaşından büyük 12 çocuktan 7'si spesifik lenfosit stimülasyonu göstermiştir (27).

Martin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada M.pneumoniae ile enfekte olmuş kişilerin lenfositlerinin ortama organizma eklenince kemotaksi gösterdiğini, enfeksiyon öncesi toplanan lökositlerde bu olayın gözlenmediğini belirlediler (28).

C) Non Spesifik Cevaplar: Soğuk aglütininer: M.pneumoniae tanısında yararlı olabilirler. Soğuk aglütininer, eritrositlerin I antijenine karşı yönlendirilmişlerdir (29). Soğuk aglütininer M.pneumoniae pnömönilerinin yaklaşık %75'inde pozitif saptanabilir. M.pneumoniae'li hastalar hemolitik olmayan streptokokların MG yapısına,

M.genitalium'a, M.mycoides'e de karşı antikor oluştururlar. M.pneumoniae'lı hastaların serumlarındaki diğer heterolog antikorlar düz kas, beyin, akciğer, karaciğer ve Wasserman kardiyolipin antiijenine karşıdır.

Biberfeld ve Norberg trombosit agregasyon yöntemiyle 39 hastanın 16'sında serum komplekslerinin varlığını göstermişlerdir (25). Ayrıca son yayınlarda M.pneumoniae ile enfekte kişilerde romatoid faktör varlığı gösterilmiştir.

● Spesifik Tanı

1) Serum Soğuk Aglütininleri: Diagnostik değeri oldukça tartışmalı olmasına rağmen uygun şekilde kullanıldığında basit ve yararlı bir test olarak karşımıza çıkmaktadır. Soğuk aglütininlerle tanı özellikle M.pneumoniae'nin alt solunum yollarında kesin etkinlik gösterdiği durumlarda değerli olmaktadır. Pnömoni olgularıyla yapılan bir çok çalışmada 1:32'ye eşit veya daha fazla titrelerde saptanan serum soğuk aglütininleri %50-90 arasında enfeksiyon etkeni olarak M.pneumoniae'ya işaret etmektedir (30). Genellikle soğuk aglütininin yüksekliği pulmoner katılımanın ciddiyeti ile doğru orantılıdır. Yaygın lobar katılımı olan hastaların soğuk aglütinin titreleri yüksek gelirken ($\geq 1:32$) minimal respiratuvar katılımı olanların titreleri negatif de gelebilir. Titrenin yüksek gelmesi özellikle M.pneumoniae enfeksiyonuna işaret eder (31).

Soğuk aglütininlerin hızlı ve yararlı bir yöntemle gösterilmesi olasıdır. Dört damla hasta kanı, sodyum sitrat veya başka bir antikoagülan içeren bir tübe konur. Tüp buzlu suya (0°-4°C) yerleştirilir. 30 sn kadar buzlukta bekletilir. Kaba aglütinasyon tüp sağa sola eğilerek incelenir. Tüp ısıtıldığında aglütinasyon kaybolmalı ve tekrar buzlu su ile soğutma uygulandığında yeniden oluşmalıdır (32).

2) **Spesifik Antikor Tayini:** Immunofloresans , büyüme inhibisyonu, indirekt hemagglütinasyon, presipitasyon, mycoplasmasidal antikor, kompleman fiksasyon, ELISA, aderans inhibisyonu, radioimmunospresipitasyon, radioimmunoassay M.pneumoniae tanısında serum antikorlarını ölçmek için kullanılabilirler. Bu testler arasında özellikle yurt dışında rutin olarak kullanılan kompleman fikse eden antikorlardır. Bu antikorlarda oluşan dört katı artış akut M.pneumoniae enfeksiyonunu gösterir. Tek yüksek titreler ($\geq 1:256$) genellikle yakın geçmişteki enfeksiyonu belirlerken, nadiren kesin M.pneumonia enfeksiyonuna işaret eder. M.pneumoniae enfeksiyonları uzun bir inkübasyon dönemini takiben oluştukları için antikor oluşumu genellikle akut hastalık oluşumunda anlamlı düzeylere ulaşır. Titredeki 4 katlık artış, akut dönemde 5-7 gün ara ile toplanan serumlarda saptanırsa tanı kesinleşir.

3) **DNA Probe Testi:** I^{125} ile işaretlenmiş M.pneumoniae'nin ribozomal RNA'sına homolog, komplemanter DNA'yı kullanan türe spesifik probe (Gen-Probe) ile patojenin boğaz sürüntüsü örneğinden direkt olarak tanısının konabileceği gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, DNA probe testinin sensitivitesinin yükseltildiği zaman pediatri kliniklerinde çabuk tanı için kullanılabileceğini göstermiştir (33).

4) **Mikropartikül Agglütinasyon ve "Antibody-Capture**

Enzyme" Immunoassay (MAG, ELA-EIA): Son yıllarda yapılan çalışmalarda, M.pneumoniae enfeksiyonlarının erken tanısında "M₁ chain capture enzyme immunoassay" (EIA) olarak tanımlanan yöntemler oldukça değerli gözükmektedir. Akut enfeksiyonda bakteriyel ajana karşı yükselen spesifik IgM ve IgG ölçümlerine dayanan testlerdir (34).

5) Latex Aqlütinasyon Yöntemi: Kompleman fiksasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında yüksek spesifik değeriyle dikkati çekmektedir (35).

6) İndirekt Hemaqlütinasyon Testi: Araştırmacılardan Hossain ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda kompleman fiksasyon testi ile karşılaştırıldığında bu yöntemin daha sensitif olduğunu gösterdiler (36).

(Kompleman fiksasyonu >1:8 titrede indirekt hemaqlütinasyon >1:20 titrede anlamlı sayılmaktadır.)

7) Kültür: M.pneumoniae yavaş büyüyen bir mikroorganizma olduğu için, kültürde üreme süresi 1 haftadan uzun olmaktadır. Bu rutin çalışmalarda kültürün tanısal yararlılığını azaltmaktadır.

Modifiye (SP-4) mediumunda diğer yöntemlerden daha sağlıklı olarak agar immunofloresans yöntemiyle tanı sağlanabilir. (37).

● Ayırıcı Tanı

M.pneumoniae enfeksiyonlarının, çocuklarda çok sık görülen diğer viral (özellikle adenovirus, parainfluenza ve influenza), chlamydia psittaci, coxiella burnetti, bakteriyel (histoplasma capsulatum ve coccidioides immitis) ile ayırıcı tanı yapılmalıdır. Klinik belirtiler ve radyografik görüntüler benzer olduğu için hastanın immunolojik durumu, yaşı, inkübasyon süresi önem kazanmaktadır.

Diğer koşullarda sağlıklı olan çocukların (özellikle 5 yaş üzerinde) pnömonilerinde birincil etken olarak M.pneumoniae karşımıza çıkmaktadır. Nezle bulgularının olmaması M.pneumoniae pnömonilerini diğer viral etkenli pnömonilerden ayırt etmemize yardımcı olur. Lökosit sa-

yısının n6trofil bandında belirgin bir artış ile bulunması M.pneumoniae enfeksiyonundan uzaklaştıran bulgulardır. Ekzantem ve Stevens-Johnson Sendromu bulguları M.pneumoniae'den şüphe ettirirken, hemolitik anemi, eklem bulguları veya nörolojik bulguların pn6moni ile saptanması kuvvetle M.pneumoniae enfeksiyonunu dűřündürmelidir.

M.pneumoniae'nın pulmoner bulguları her zaman belirgin olmadığı için sıradışı akut veya subakut bir olguda (aseptik menenjit veya diğer nörolojik bulgularla ilerleyen hastalıkta, ekzantem, enantem, hepatit, pankreatit, perikardit ve/veya miyokardit ve artritli olan hastalarda) etiyolojik ajan olarak M.pneumoniae'yı dűřünmek ve akciğer grafisine ek olarak kűltür ve seroloji ile tanıya yönelmek gerekir (31,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47).

● Tedavi

In vitro olarak M.pneumoniae eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve birçok aminoglikozitlere hassastır. Tüm penisilinlere ve sefalosporinlere resistans gösterir.

M.pneumoniae'ya karřı bulunan ilk etkili antibiyotik dimetilklortetrasiklidir. M.pneumoniae tedavisinde ilk seçilecek ilaçlar ise eritromisin ve tetrasiklinlerdir. Tetrasiklinlerin çocukluk yař gruplarındaki yan etkilerinden dolayı seçilecek en uygun ilaç eritromisindir. Eritromisinin dozu, 10 gűnden az olmamak kořuluyla, 6 saat arayla uygulanacak gűnlük total 50 mg/kg'dır.

Jensen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada profilaktik olarak aile içi kontaktlara verilen oksitetrasiklinin hastalık oluşumunu önlediğini ancak enfekte olmaya etki etmediğini göstermişlerdir (38).

M.pneumoniae enfeksiyonlu çocuklar ağır fizik aktiviteden akut hastalık dönemi ve bunu takip eden iki haftalık dönemde alıkonmalıdırlar. Büyük çocuklar öksürüğün devam ettiği süre boyunca, antibiyotik tedavisine rağmen bulaştırıcı olduklarına dair uyarılmalıdırlar.

● Aşılama

Fernald ve Glezen adlı araştırmacılar inaktive M.pneumoniae ile çocuklarda yaptıkları bir çalışmada, aşılananların çoğunun lenfosit duyarlılığını geliştirdiklerini ancak hümorale antikor cevabını vermediklerini gözlemlediler (48).

Smith ve arkadaşları erişkinlerde yaptıkları benzer bir aşılama çalışmasında aşılama sonrası bazı kişilerde abartılı bir hastalık tablosu oluştuğunu ve immünizasyon sonrası görülen humoral cevabın oluşmamasını, ölü kızamık aşısının etkisizliği gibi, antikorların yok edilip devam eden hücresel immünitinin kalıcılığı ile açıkladılar (49).

Lenfosit hassasiyeti ve humoral immünite ardarda M.pneumoniae enfeksiyonu geçiren çocuklarda artar. Ancak etken ile karşılaşma olmaz ise koruyucu antikorlarda azalma olur. Ancak spesifik hücresel immünite kazanılırsa koruyuculuk devam eder.

Isıya duyarlı bir mutant ile yapılan canlı aşı ile daha olumlu sonuçlar alındıysa da doğal M.pneumoniae ile oluşan reenfeksiyonların sıklığı ve sensitizasyonun patogeneizde oynayabileceği alevlendirici rol gözönüne alınınca, çocuklarda aşılanmanın rutine alınması uzak bir gelecek gibi gözükmektedir (50).

MATERYAL VE METOD

Araştırmamızda metod olarak aşağıda açıklanan üç serolojik yöntem karşılaştırmalı olarak, Ekim 1991-Ağustos 1992 tarihleri arasında pnömoni ön tanısı ile interne edilen, etken olarak M.pneumoniae düşünülen 5-15 yaş arası pnömonili hastalara uygulandı.

YÖNTEM

I) M.Pneumoniae Latex Aglütinasyon Testi

Latex Aglütinasyon Testi (MeristarTM - MP) M.pneumoniae'ya özel serumda oluşan IgG ve IgM antikorlarını kalitatif olarak gösteren bir testtir.

Latex aglütinasyon testi, latex partiküllerine bağlanan spesifik M.pneumoniae hücre membranı antijenlerini kullanır. Kısa sürede cevap alınabilen bu kalitatif test serum örneklerinde M.pneumoniae'ya karşı oluşan antikorları belirlerken özel laboratuvar tekniklerine gereksinim duymadan, rutindeki kompleman fiksasyon gibi düşük sensitivite değerli metodlardan üstün sonuçlar vermektedir (51,52).

Biyolojik Prensipler: Latex aglütinasyon prensipleriyle hazırlanan bu testde, latex partikülleri M.pneumoniae hücre membranlarından elde edilen spesifik antijenlerle kaplanmış olup, latex araştırmacı ayırıcı (Latex Detection Reagent) hasta serumu ile karıştırıldığı zaman eğer serum IgG ve/veya IgM antikorlarını içeriyorsa latex partiküllerinde gözle görülür bir aglütinasyon

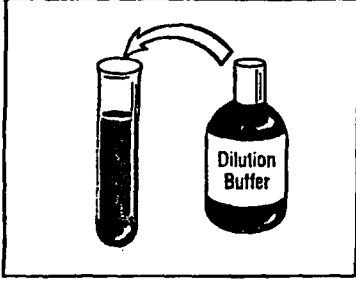
oluşur. In vitro tanı yöntemi olarak kullanılan bu test-
de ısı ile inaktive edilmiş serum kullanılması doğru de-
ğildir.

© Serumun hazırlanması

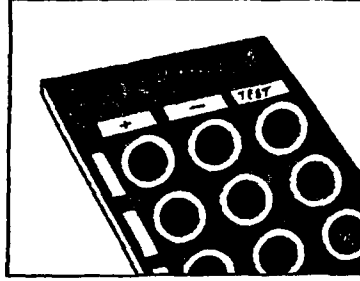
1. Aseptik şartlarda tam kan antikoagülan içermeyen tüp-
lere toplanır.
2. Oda sıcaklığında 10 dakika kanın pıhtılaşması sağla-
nır.
3. 1000xg'de 10 dakika santrifüje edilir.
4. Üstte biriken serum steril tüpe aktarılır.
5. Örnek hemen test edilebilirse de 2-8°C'da 24 saat
dondurularak bekletilebilir. Dondurulup çözüldükten
sonra serum ikinci kez kullanılmaz.
6. Kontamine, hemolize veya lipemik serumlar, örneğin
uygun olmayan ısılarla karşılaştığını belirlediği
için kullanılmamalıdır.

© Test işlemleri (Şekil 1)

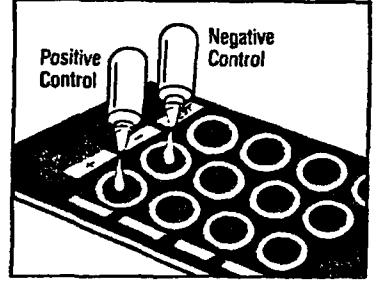
1. Serum örneği "Dilüsyon Sıvısı" ile dilüe edilir.
100 µl'lik dilüsyon sıvısı bir pipet ile test tüpüne
aktarılır, üzerine 10 µl hasta serumu eklenir. Vorteks
metoduyla karıştırılır.
2. Cam test zemininde hasta ve kontrol bölümleri önceden
işaretlenir.
3. İşaretlenen bölgelere (+) ve (-) kontrol ayıraçların-
dan birer damla konur.
4. 25 µl'lik pipet ile dilüe edilen serumdan uygun yer-
lere birer damla damlatılır.
5. Latex Araştırmacı Ayırıcı (Latex Detection Reagent)
hafifçe sallanarak karıştırıldıktan sonra hasta,
kontrol ve test bölümlerine birer damla eklenir.



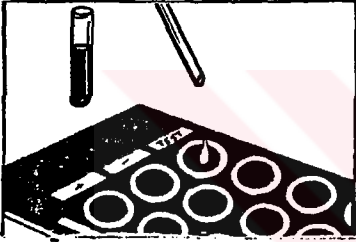
1.



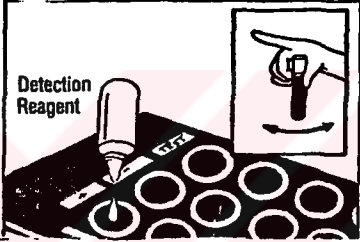
2.



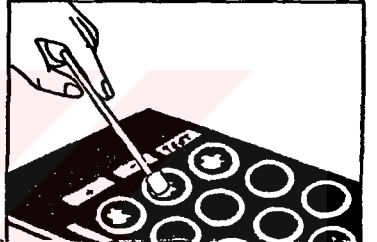
3.



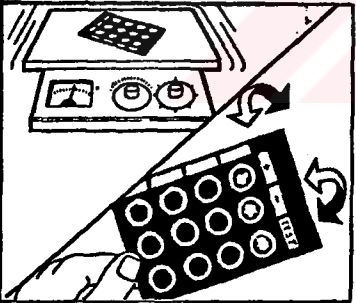
4.



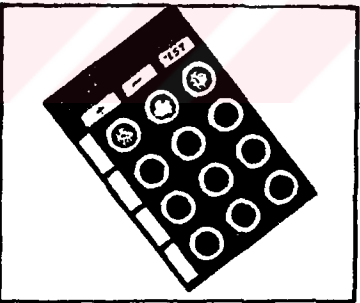
5.



6.



7.



8.

Şekil 1. Mycoplasma pneumoniae test işlemleri

6. Her daire içine alınan bölümdeki sıvılar pipetin ucu ile hafifçe karıştırılır.
7. 90-100 rpm ile rotatörde veya elde 4 dakika süreyle cam zemin sallanır.
8. Dört dakikanın sonunda test bölümündeki aglütinasyon varlığı (+) ayıraçtaki aglütinasyon oluşumu karşılaştırılır (pozitif kontrol ayıracında her zaman aglütinasyon oluşması gerekirken negatif kontrol ayıracı ile hiç bir zaman aglütinasyon oluşmaz. Eğer bu uygun aglütinasyonlar gözlenmezse test geçersizdir).

© Test reaksiyonları

1. Pozitif Test Sonucu: Hasta serumunun konduğu test bölümünde herhangi bir derecede aglütinasyon gözlemlenirse, örnek M.pneumoniae antikorları (+) şeklinde değerlendirilmelidir.
2. Negatif Test Sonucu: Kontrol bölümünde hasta serumu ile hiçbir aglütinasyon belirtisi gözlemlenmez ise hasta kan örneğinin M.pneumoniae antikorları içermediği rapor edilmelidir.

Hasta serum örnekleri, bu testi uygulamak için, akut M.pneumoniae enfeksiyonu klinik bulguları belirir belirmez alınmalıdır; eğer (-) sonuç alınır, klinik semptomların devamlılığı koşulu ile iki hafta sonra ikinci bir örnek alınmalıdır. İkinci örnekte alınacak olan (+) bir sonuç, akut enfeksiyonu belirler.

Klinik olarak aktif M.pneumoniae enfeksiyonu olan hastalar tipik olarak M.pneumoniae antikorları oluşturarak, test sonuçlarını pozitif olarak verirler.

Antikor düzeyleri enfeksiyon sonrası uzun süreler yüksek kalır. Tek bir sefer alınan (+) test sonucu daha önce geçirilmiş M.pneumoniae enfeksiyonlarını da gösterir.

rir. Antinükleer antikorları veya romatoid faktörü pozitif olanlarda yalancı pozitiflikler görülebilir.

© Klinik çalışmalar

Latex aglütinasyon testi kompleman fiksasyon testiyle karşılaştırmalı çalışıldığında özellikle sensitive açısından üstün sonuçlar vermiştir.

Verilerin Spesifitesi: Adenovirus, Influenza A, Respiratuvar sinsisyal virus, toksoplazma antikorları olan hastalar latex aglütinasyon testinde (-) sonuç vermektedir.

Bu testte spesifiklik oranı %77, duyarlılık %96 ve kompleman fiksasyon testi ile uyum %97'dir.

II. Soğuk Aglütinasyon-Paul Bunnel Testi

© Gerekli Malzeme

1. %0.9 NaCl (tuzlu su)
2. 0Rh (+) insan kanı (soğuk aglütinasyonda kullanılır)
3. Koyun kanı (Paul Bunnel'de kullanılır)
4. Hasta serumu

© Uygulama

Hasta serumu 2 cc tuzlu su, 0.5 cc hasta serumu olarak bir tüpte hazırlanır. 56°C'da 30 dakika inaktive edilir. İnsan ve koyun kanından %2'lik süspansiyon hazırlanır. Yedi deney tüpüne %0.9 NaCl konur, üzerine ikinci tüpten başlayarak inaktive edilmiş hasta serumu eklenir. 0.25 cc her tüpe aktarılarak 7.tüpten dışarı atılır. Daha sonra %2'lik yıkanmış eritrosit süspansiyonu her tüpe 0.1 cc eklenerek tamamlanır.

© Değerlendirme

SOĞUK AGLÜTİNASYON: Buzdolabında bir gece bekletildikten sonra aglütinasyon gözlenir.

PAUL BUNNEL: Bir gece oda ısısında, ardından 2 saat 37°C'lik etüvde bekletilir ve aglütinasyon gözlenir.

III. ELISA Yöntemi

Spesifik mycoplasma IgG veya IgM antikörlerini insan serumunda saptayan enzim immunoassay yöntemidir. İnaktive spesifik bir antikor ile kaplı deney sisteminin kullanılmasına dayanan bu yöntemde örnek serum spesifik antikörleri içerdiğinde deney sistemi ile reaksiyona girmektedir. Oda ısısında inkübasyon, anti-human IgG içeren konjugat solüsyonuna peroksidaz eklenmesi ve tekrar inkübasyondan sonra bağlanmayan antikörlerin eliminasyonu için yıkama yapılır. Oluşan substrat / kromojen solüsyonunu 10 dakika daha oda ısısında inkübe ettikten sonra oluşan antikor antijen kompleksinin peroksidaz konjugatı ile oluşturduğu mavi renk izlenir. Renk oluşumu reaksiyonu durdurucu ayırıcın eklenmesiyle durdurulur. Bu eklemeden sonra renk sarıya dönüşür. Bu renk spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçülür. Mycoplasma antijenlerine karşı oluşan spesifik IgG antikor konsantrasyonları test örneğinin renk yoğunluğu ile direkt orantılıdır.

ELISA sayacında okunan optik dansiteler not edilir. Negatif kontrollerin optik dansitesi düşük değerli pozitif kontrollerinden az olması gerekirken bu iki değer arası (düşük değerli (+) kontrol optik dansitesi/(-) kontrol optik dansitesi) oran 1.5'dan büyük olmalıdır. Bu arada yüksek değerli pozitif kontrol ile düşük de-

gerli pozitif kontrol arası oranda 1'den büyük olmalıdır.

Yöntemin kesim değeri (cut-off value) düşük değerli (+) kontrollerin ortalamasıdır. Serum örneğinin optik dansitesinin bu oran ile büyümesinde 1.0'dan büyük olarak elde edilen diğer testin (+) olduğunu, 1.0'dan küçük olarak elde edilen değer ise testin (-) olduğunu gösterir. Oran 0.9-1.1 arasında gelirse testin yeni serum örneği ile 2-4 hafta içinde yeniden yapılmasını gerektirir (53).

BULGULAR

Bulgular Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Olguların Dökümü

Olgular	Şikayet	Klinik Bulgu	Laboratuvar	Tedavi
1 5.5 yaşında kız çocuk	Nefes darlığı, Ateş	Taşipne, sol akciğer alanlarında kaba raller Ön tanı: Pnömoni Astım bronşiale (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin
2 5 yaşında kız çocuk	Öksürük, ateş, nefes darlığı	Ekspiriyum uzaması, sağ ve sol akciğer alanlarında sibilan raller Ön tanı: Pnömoni Astım bronşiale (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin.
3 11 yaşında kız çocuk	Öksürük, boğaz ağrısı, halsizlik (ailede anejizan hastalık +)	Bilateral ince krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-) RG= Maksiller sinüzit.ANA (+)	Klindamisin + Amikasin
4 6 yaşında kız çocuk	Öksürük	Bilateral krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-) Akciğer ultras. Parapnömonik infiltras. (+)	Klindamisin

Tablo 2 (devam)

Olgular	Şikayet	Klinik Bulgu	Laboratuvar	Tedavi
5 8 yaşında erkek çocuk	Öksürük, nefes darlığı	Taşipne, ekspiriyum uzun, sibilan raller Ön tanı: Pnömoni Astim bronşiale (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin
6 6 yaşında kız çocuk	Öksürük, nefes darlığı	Ekspiriyum uzun, krepitan ve sibilan raller Ön tanı: Pnömoni Astim bronşiale (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-) Ev tozuna allerji (+)	Sulbaktam + Ampisilin + İmmünoterapi
7 9 yaşında kız çocuğu	Öksürük, hafif balgam çıkarma	Ekspiriyum uzun Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin
8 5 yaşında kız çocuk	Ateş, nefes darlığı bilinç bulanıklığı, baş ağrısı	İnterkostal çekilme- ler, bilateral krepitan raller, meningeal bulgu (-) Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Klindamisin + Netilmisin sülfat
9 5 yaşında kız çocuk	Öksürük, ateş, nefes darlığı	Krepitan raller Ön tanı: Pnömoni Astim bronşiale (?) Tbc (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Anti Tbc. tedavi
10 12 yaşında kız çocuk	Terleme, öksürük, karın ağrısı	Krepitan raller, sağda matite ve frotman, mezokardiak odakda 2/6 şiddetinde üfürüm Ön tanı: Pnömoni Tbc bronşiektazi (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Seftazidim + Mezlosilin

Tablo 2. (devam)

Olgular	Şikayet	Klinik Bulgu	Laboratuvar	Tedavi
11 6 yaşında kız çocuk	Ateş, öksürük, nefes darlığı	Ekspiryum uzun, sibilan raller (+), Wheezing Ön tanı: Pnömoni Astım bronşiale (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol) R.G=Maksiller sinüzit(+)	Sulbaktam + Ampisilin
12 5 yaşında erkek çocuk	Ateş, öksürük, nefes darlığı	Dispne, ekspiryum uzaması, yaygın ve krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol)	Kristalize penisilin (Aile içi Tbc (+) :Rifampisin profilaksisi)
13 13 yaşında erkek çocuk	Öksürük, nefes darlığı	Bilateral sibilan raller, ekspiryumda uzama Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol)	Sulbaktam + Ampisilin
14 5 yaşında erkek çocuk	Öksürük, ateş, halsizlik, nefes darlığı	Ekspiryumda uzama, dispne, sağ akciğer bölgesinde solunum seslerinde azalma. Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol)	Sulbaktam + Ampisilin
15 7 yaşında erkek çocuk	Öksürük, ateş	Ekspiryumda uzama, yaygın krepitan raller. Kaidede matite (+) Ön tanı: Pnömoni Plörezi (?)	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol) Torosentezde sivi (-)	Sulbaktam + Ampisilin
16 11 yaşında erkek çocuk	Ateş, öksürük, hırıltı	Bilateral krepitan raller Ön tanı : Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (-) (Kontrol)	Mezlosilin

Tablo 2. (devam)

Olgular	Şikayet	Klinik Bulgu	Laboratuvar	Tedavi
17 10 yaşında erkek çocuk	Ateş, öksürük, hırıltı	Krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Mezlosilin
18 6 yaşında erkek çocuk	Öksürük, ateş	Ekspiriyumda uzama, krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin
19 7 yaşında kız çocuğu	Ateş, öksürük	Yaygın krepitan raller Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Sulbaktam + Ampisilin
20 5 yaşında erkek çocuk	Ateş, öksürük, halsizlik, nefes darlığı	Ekspiriyumda uzama, yer yer krepitan raller. Ön tanı: Pnömoni	Soğuk Ag. (-) ELISA IgM (-) Latex Ag. (-) Latex Ag. (Kontrol) (-)	Klindamisin

Araştırmamıza olgu olarak katılan hastaların 11'i kız, 9'u erkek çocuktur. Şikayetler ele alındığında öksürük %90, ateş %65, nefes darlığı %50, halsizlik %5, hırıltı %5, terleme %5 oranlarında sıklık sırasıyla birbirini takip etmişlerdir.

Öksürük genellikle non-prodükatif olarak tarif edilmişse de bir olguda balgam çıkarma öyküsü saptanmıştır. Karın ağrısı gösteren tek olgu diğer gastrointestinal patolojiler açısından incelenmiş ve ek bir patolojiye rastlanmamıştır. Allerji öyküsü veren tek olguda ayrıntılı incelemede belirgin bir enanem veya ekzanem bulgusu saptanmamıştır.

Pnömoni klinik tanısı çocuklarda akut üst solunum yolu infeksiyonunu takiben ani ateş yükselmesi, taşipne, öksürük kriterleri göz önüne alınarak konmuştur. Lober pnömonilerde solunum seslerinin azalması, ince krepitan rallerin varlığı; interstisyel pnömonide uzamış ekspiryum ve Wheezing varlığı da değerlendirilmiştir. Olguların tümünde çekilen akciğer grafilerinde M.pneumoniae'yi da düşündürecek infiltrasyon alanları saptanarak pnömoni ön tanısı konmuştur. Ön tanıda tekrarlayan öksürük atakları olan 6 vakada (%30) birlikte astım bronşiale düşünülmüştür. Bu olgularda fitohemoglütinin, kandida gibi etkenlere karşı allerjizan cevap incelendi. 1 olguda (%5) ev tozları da dahil olmak üzere kesin allerjizan cevap alındı. Burada olası etken olan M.pneumoniae'ya karşı oluşan spesifik IgE cevabı varlığı, ayrıca araştırma konusu olarak ele alınması uygun görüldüğü için bu çalışma kapsamına alınmadı.

Çekilen grafi ile de plörezi düşünülen tek olguya yapılan torasentez müdahalesi gereken sıvının toplanmasıyla sonuçlandı. Baş ağrısı şikayeti olan bir diğer olgu menengeal bulgu ve BOS incelemesi sonucunda negatif santral sinir sistemi bulgusu verdi.

Tüm hastalardan alınan hemokültür sonuçları negatifti. İmmünolojik incelemede antikor düzeyleri spesifik bir patoloji düşündürmeyecek düzeyde idi.

Anerjizan hastalık potansiyeli olan 1 olguda ANA (+) saptanınca Latex aglütinasyon testinde oluşabilecek yalancı negatif değer oluşumu da dikkate alınmıştır.

Çekilen grafilerde iki olguda maksiller sinüzit saptanmıştır.

Yapılan rutin incelemelerde lökosit sayısı 14.000-6.800/mm³ arasında değişirken, hematokrit değeri %36.2-%41.5, trombosit değerleri 310.000-360.000 arası bulunmuştur. Sedimentasyon değeri sadece iki olguda yüksek değer verirken, lökosit formüllerinde spesifik enfeksiyonu sonradan belirlenen iki vakada lenfosit hakimiyeti, 6 olguda ise belirgin sola kayma saptandı.

Yapılan boğaz kültürlerinde olguların 4'ünde gram (+) kok hakimiyeti saptanırken alınan mide açlık sıvılarında iki hastada aside resistant bakteri bulunması ile Tbc tanısı konmuştur. Respiratuvar sinsisyal virus gibi viral etkenler ayırıcı tanıda değerlendirildi ve olgularda seropozitiflik saptanmamıştır.

M.pneumoniae serolojik tanısını sağlayacak soğuk aglütinin, ELISA IgM ve 10 gün arayla çift kontrollü çalışılan Latex aglütinasyon testi sonuçları negatif olarak tespit edildi.

TARTIŞMA

M.pneumoniae 5-15 yaş arası çocuklarda sık pnömoni etkenlerinden biridir. Tedavi edilmediği takdirde iki haftadan az bir klinik seyir gösterirken, öksürük aylarca sürebilir. Araştırmamızda olgu olarak yer alan 11 kız, 9 erkek çocuğun yakınmaları ele alındığında öksürük %90 olguda saptanmıştır. Bunu ateş %65, nefes darlığı %50 sıklık sırasıyla izlemişlerdir. Halsizlik, hırıltı, baş ağrısı, karın ağrısı, bilinç bulanıklığı, terleme, allerjik döküntü %5 oranında gözlemlenmiştir. Bu bulgular M.pneumoniae enfeksiyonunu düşündürebilmesine rağmen hiçbiri klinik olarak tanı koydurucu değildir. M.pneumoniae ile enfekte olan hastaların %10'undan azının tedavi kurumlarına başvurduğu dikkate alınırsa toplumda sık görülen bu etkenin genelde hafif semptomatoloji verdiği ortaya çıkmaktadır.

Pnömoni semptomatolojisi veren olgularda raller ve konsolidasyon belirtileri genellikle bulunmaktadır. Olgularımızın %65'inde yaygın kreptan ral, %5'inde erken dispne bulgusu olarak ekspiriyumda uzama, %25'inde sibilan raller, pnömoni ön tanısını koydururken, %10'unda alınan matite ile plörezi ve bronşiektazi ayırıcı tanılarına yönelinmiştir.

Literatürde de M.pneumoniae pnömonisi olan hastaların %75'inde oskültatuar bulgu olarak pnömoniyi belirleyen raller mevcuttur. Raller hastalığın başlangıcından iki hafta sonraya kadar duyulur ve daha sonra kaybolurlar. Bazen hastalar göğüs radyografilerinin

anormal bulgu vermesine karşı oskültasyon bulgusuna sahip olmayabilirler. Ancak bizim olgularımızın hepsi göğüs radyografisindeki patolojinin yanısıra oskültasyon bulgularına da sahiptiler.

Primer atipik pnömoninin radyolojisi genelde değişkendir. Ancak çift taraflı, difüz, retiküler infiltratlar sık görülen komponentlerdir (54). Tipik lobar pnömoni, alveoler konsolidasyon, interstisyel (retiküler ve nodüloretiküler), hiler veya paratrakeal lenf nodülleri ve plevral efüzyon karşılaşılabilen patolojiler olarak literatürde sayılırken bizim de olgularımız bu değişken radyolojik imajlara uygunluk göstermekteydi.

Literatürde M.pneumoniae pnömonisi olan hastaların %50'sinde belirlenen farenjit veya nazofarenjit bulgusuna çalışmamızda rastlanmamıştır.

M.pneumoniae pnömonisi olan olguların %5'inde saptanabilen ve saptandığında tanı koydurucu nitelikte olan otitis media ve büllü hemorajik mirenjit olgularımızda tespit edilememiştir.

Sinüzit literatürde nadiren görülen bir bulgu olarak değerlendirilirken, bizim olgularımızda %10 oranında maksiller sinüzit saptanmıştır.

M.pneumoniae aynı zamanda astmatik bronşitte ve tekrarlayan Wheezing'li astımı olan çocuklarda rölatif sıklık gösteren bir etkidir. Olgularımızın %30'u Astım bronşiale ön tanısı altında bu açıdan da değerlendirilmeye çalışılmış %5 olguda Wheezing kesin olarak saptanmıştır. Literatürde yapılan geniş kapsamlı çalışmalar Wheezing'in çocukluk yaş gruplarında %40 oranında saptandığını göstermiştir.

M.pneumoniae pnömonisi bazı olgularda ekzantem ve enantem bulguları ile birlikte görülebilir. Eritematöz

makülopapüler döküntü gövde ve sırtta lokalize olurken en ciddi komplikasyonlar eritema multiforme ve Stevens Johnson (ağır stomatit + konjunktivit) sendromudur. Sadece çocuk hastalar üzerinde yapılan bir araştırmada Stevens ve arkadaşları olguların %9'unda ekzantem saptamışlardır (31).

Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda pulmoner bulgular gösteren M.pneumoniae enfeksiyonlarında klinik olarak gözlenemeyen kompanse bir hemoliz varlığını göstermişlerdir (45). Bu bilgi ışığında tüm olgularımızın kan değerleri saptanmış normal sınırlar içinde gelen değerler klinik takibe alınmıştır.

Bir olgumuzda mezokardiyak odakta saptanan 2/6 şiddetindeki sistolik üfürüm, hastalığın kardiyak katılımından çok fonksiyonel bir üfürüm olarak değerlendirilmiştir. Bu olguda EKG (elektrokardiyografi) incelemesinde patoloji saptanmamıştır.

M.pneumoniae enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %25'inde bulantı, kusma ve/veya diyare gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda Stevens ve arkadaşları, gözleme alınan 44 çocuğun %15'inde karın ağrısı gözlemlenildi (31). Bizim olgularımızda ise karın ağrısı %5 oranında görülmektedir.

M.pneumoniae pnömonilerinde nörolojik bulguların birlikte bulunabileceği belirtilmişse de literatürde bu konuda yapılan çalışmalar belli bir oran verecek düzeyde değildir. Çalışmamızda bilinç bulanıklığı ve baş ağrısı olan tek olguda yapılan tetkiklerde nöropatolojik bulgu saptanmamıştır.

Torosentezde sıvı alınamayacak kadar küçük plevral efüzyonlar literatürde M.pneumoniae ile %20 oranında görülme nispetiyle yayınlanmıştır. Olgularımızda %5

oranında saptanan matite ve radyolojik imaj plöresi varlığını düşündürmüş, ancak literatür ile de uyumlu olarak yeterli torosentez sıvısı alınamamıştır.

Serolojik tanıda, Kopenhag'da yaptığı çalışmada Hornsleth, hospitalize edilmiş 367 çocuğun Eylül 1963-Mayıs 1965 tarihleri arasında, topladığı serumlarında kompleman fikse eden antikorları araştırmış, 6-11 aylık süt çocuklarının %42'sinin antikorlarının demonstratif olduğunu, 1-9 yaş arasındakilerin ise üçte ikisinde belirgin antikor titrelerini tespit etmiştir (55). Suhs ve Feldman ise hemaglutinasyon inhibisyon yöntemi ile benzer şekilde, hasta serumlarında yüksek bir antikor varlığını Alaska'da Point Barrow yöresinde göstermişlerdir (56).

Brunner ve arkadaşları duyarlı radioimmunopresipitasyon yöntemiyle yaptıkları serum antikor testlerinde 7-12 ay arası süt çocuklarında %28, 13-24 ay arası çocuklarda %55, 25-60 ay arasındakilerde %67 ve 17 yaşından büyüklerde %97 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Antikor titrelerindeki bu artışı tekrarlayan enfeksiyonlara bağlamışlardır. Tüm bu çalışmalardaki sonuçlar duyarlı bir popülasyonda yılda %20-30 insidans verirken, bu yüksek oran doğada bulunan çapraz reaksiyon veren antijenlere bağlanmaya çalışılmıştır. Ancak Fernald ve arkadaşları bir kreşte yaptıkları çalışmada yıllık enfeksiyon hızını %12 bulurken, M.pneumoniae ile enfekte olmuş 22 çocuğun 5'inde daha sonra 5 yıllık izleme süresinde yeniden enfeksiyon oluştuğunu gözlemişlerdir (27).

Yukarıda açıklanan testlerin spesifik değerlerinin düşük olması nedeniyle geliştirilen ELISA tekniği ile IgM ve IgG spesifik antikorlarının gösterildiği bir çalışmada Jacobs ve arkadaşları başarılı sonuçlar

elde etmişlerdir (57). Yapılan ELISA çalışmalarından sonra yeni bir teknik olarak geliştirilen Latex aglütinasyon testi daha hızlı sonuç verirken yüksek duyarlılık ve kompleman fiksasyon testiyle uyum açısından umut verici sonuçlar vermiştir (35).

Çalışmamızda soğuk aglütinin, ELISA IgM ve çift kontrollü latex aglütinasyon testi sonuçları negatif gelmiştir. ANA (antinükleer antikoru) pozitif olan tek vakanın Latex testini yalancı pozitif verme olasılığına rağmen bu vakada diğer serolojik test sonuçları da negatif gelmiştir.

Değerlendirmeye alınan tüm olgular yaklaşık bir yıllık süre içerisinde büyük bir titizlikle seçilmiş olmalarına rağmen etken olarak M.pneumoniae'nın saptanmamış olması bu etkenin toplumda hospitalizasyona gereksinim göstermeyen pnömonilerde daha sıklıkla bulunduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamız, etkenin saptanması için poliklinik ve ayaktan tedavi merkezlerini içerecek epidemiyolojik tarama çalışmalarına gereksinim olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmanın yurdumuzda önemli bir çocuk sağlığı sorunu olan, özellikle beş yaş sonrası, pnömonilerin tüm Dünya literatüründe yer alan en sık etkeni M.pneumoniae'nın ülkemizdeki epidemiyolojisinin incelenmesinde, yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Ekim 1991-Ağustos 1992 tarihleri arasında kliniğimizce interne edilen nedeni bilinmeyen pnömoni olgusu olan 11 kız 9 erkek hastada M.pneumoniae'nın etken olarak belirlenmesine çalışıldı.

Yakınma bulgularında öksürük (%90), ateş (%65), nefes darlığı (%50) oranında bulunurken, radyografik görünümünde saptanan lobar ve interstisyel pnömoni odaklarıyla etken olarak M.pneumoniae'yı düşünmede literatür ile uygunluk sağlanmıştır.

Yapılan diğer klinik ve rutin laboratuvar incelemelerinde M.pneumoniae'nın neden olabileceği pulmoner tutulum dışı tüm komplikasyonlar değerlendirilmiş, ancak patolojik bir sonuç saptanmamıştır.

M.pneumoniae'nın spesifik serolojik tanısı için yapılan soğuk aglütinasyon, ELISA IgM ve Latex aglütinasyon testlerinden negatif sonuç elde edilmiştir. Bunlar arasında Latex aglütinasyon testi kolay uygulanabilirliği ve hızlı sonuç vermesi açısından dikkati çekmektedir.

ÖZET

Bu çalışmada M.pneumoniae enfeksiyonu düşünülen, Ekim 1991-Ağustos 1992 tarihleri arasında kliniğimizce enterne edilen, 20 hastadan alınan serum örneklerinde (akut ve konvelasans dönemde) soğuk aglütinasyon, konvansiyonel yöntem olarak, ELISA IgM, akut enfeksiyonu spesifiye etmek için ve daha çabuk ve kolay uygulanabilir bir metod olan Latex aglütinasyon testi karşılaştırılmalı olarak uygulandı.

Sonuçlar bu vakalarda M.pneumoniae'nın enfeksiyon etkeni olmadığını gösterdi.

Ülkemizde M.pneumoniae'ya bağlı pnömonilerin sıklığının, pratik ve kısa sürede sonuç veren Latex aglütinasyon testi ile, hastaneye yatması gerekmeyen akciğer enfeksiyonlarına yönelik taramalarda, belirlenmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ralph D. Feigin, J.D. Cherry: Textbook of Pediatric Infectious Diseases: Mycoplasma and Ureaplasma Infections, Second Edition Volume II: 1896-1911, 1987.
2. Chanock R.M., Hayflick L., Barile M.F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc Natl Acad Sci 48: 41-49, 1962.
3. Eaton M.D., Liu C.: Studies on sensitivity to streptomycin of the atypical pneumoniae agent. J Bacteriol 74: 784-787, 1957.
4. Freundt E.A., Edward D.G. ff: Classification and taxonomy in Barile M.F., and Razin S. (eds): The Mycoplasmas, Vol I, New York, Academic Press, pp:1-41, 1979.
5. Almagor M., Yatzir S., Kahane I.: Inhibition of host cell catalase by Mycoplasma pneumoniae: A possible mechanism for cell injury. Infect Immun 41: 251-256, 1983.
6. J. Keith Mansel, M.D., F.C.C.P.; Edward C. Rosenow III. M.D., F.C.C.P.; Thomas F. Smith Ph.D.; James W. Martin Jr. M.D.: Today's practice of cardiopulmonary medicine-Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. Chest: Mar 95-3, 639-646, 1989.

7. Hanukoğlu A., Hebroni S., Fried D.: Pulmonary involvement in *Mycoplasma pneumoniae* infection in families, *Infection* 14: 1-6, 1986.
8. Wilson M.H., Collier A.M.: Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J Bacteriol.* 125: 332-339, 1976.
9. Bredt W.: Filamentous growth of some mycoplasma species of man. *Experientia* 25: 1118-1119, 1969.
10. Neimark H.C.: Division of mycoplasmas into subgroups. *J Gen Microbiol* 63: 249-263, 1970.
11. Brunner H., James W.D., Horswood R.L., et al: Measurement of *Mycoplasma pneumoniae* mycoplasmacidal antibody in human serum. *J Immunol* 108: 1491-1498, 1972.
12. Busolo F., Tanin E., Meloni G.A.: Enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* 18: 432-435, 1983.
13. Pollack J.D., Somerson V.L., Senterfit L.B.: Isolation characterization and immunogenicity of *Mycoplasma pneumoniae* membranes. *Infect Immun* 2: 326-329, 1970.
14. Hu P.C., Huang C.H., Huang Y.S., et al: Demonstration of multiple antigenic determinants on mycoplasma pneumoniae attachment protein by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 50: 292-296, 1985.
15. Krause D.C., Baseman J.B.: Inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein. *Infect Immun* 39: 1180-1186, 1983.

16. Kenny G.E., Newton R.M.: Close serological relationship between glycolipids of *Mycoplasma pneumoniae* and glycolipids of spinach. *Ann N Y Acad Sci* 225: 54-61, 1973.
17. Foy H.M., Kenny G.E., Cooney M.K., et al.: Naturally acquired immunity to pneumoniae due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Infect Dis* 147: 967-973, 1983.
18. Noah N.D.: *Mycoplasma pneumoniae* infection in the United Kingdom. 1967-1973. *Br Med J* 1: 544-546, 1974.
19. Foy H.M., Grayston J.T., Kenny G.E., et al.: Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infection in families, *JAMA* 197: 859-866, 1966.
20. Foy H.M., Alexander E.R.: *Mycoplasma pneumoniae* infections in childhood. *Adv Pediatr* 16: 301-323, 1969.
21. Suhs R.H., Feldman H.A.: Serological epidemiologic studies with *M. pneumoniae*. II. prevalence of antibodies in several populations. *Am J Epidemiol* 83: 357-365, 1966.
22. Couch R.B.: *Mycoplasma pneumoniae* (primary atypical pneumoniae) In: Mandell G.L., Douglas, R.G., Jr. and Bennett J.E. (eds): *Principals and Practice of Infectious Diseases*. New York, John Wiley Sons, pp:1484-1498, 1980.
23. Denny F.W., Clyde W.A., Glezen W.P.: *Mycoplasma pneumoniae* diseases: Clinical spectrum, pathophysiology, epidemiology and control. *J Infect Dis* 123: 74-92, 1971.
24. Klimek J.J., Russman B.S., Quantiliani R.: *Mycoplasma pneumoniae* meningoencephalitis and transverse myelitis in associtaion with low cerebrospinal fluid glucose. *Pediatrics* 58: 133-135, 1976.

25. Biberfeld G. Antibody responses in *Mycoplasma pneumoniae* infection in relation to serum immunoglobulins especially IgM. *Acta Pathol Microbial Scand (Sect B)* 79: 620-634, 1971.
26. Tiperneni P., Moore B.S., Hyde J.S. et al.: IgE antibodies to *mycoplasma pneumoniae* in asthma and other atopic diseases. *Ann Allergy* 45: 1-7, 1980.
27. Fernald G.W., Collier A.M., Clyde W.A.: Respiratory infections due to *mycoplasma* in infants and children. *Pediatrics* 55: 327-335, 1975.
28. Mc Cormack W.M.: Epidemiology of *mycoplasma hominis* sex. *Trans Dis* 10: 261-262, 1983.
29. Costea N., Yakulis V.J., Heller P.: Inhibition of cold agglutinins (Anti-I) by *M.pneumoniae* antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 139: 476-479, 1972.
30. Stallman N.D., Allan B.C.: A survey of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in Queensland. *Med J Aust* 1: 800-802, 1970.
31. Stevens D., Swift P.G.F., Johnston P.G.B., et al.: *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *Arch Dis Child* 53: 38-42, 1978.
32. Garrow D.H.: A rapid test for the presence of increased cold agglutinins. *Br Med J* 2: 206-208, 1958.
33. Hata D., Fumiyuki K., Yasuhiro M., et al.: Evaluation of DNA probe test for rapid diagnosis of *mycoplasma pneumoniae* infections. *J of Ped* 116 (2): 273-276, 1990.
34. Echevarria J.M., Leon P., Belfagon P., et al.: Diagnosis of *mycoplasma pneumoniae* Infection by microparticle Agglutination and Antibody-capture Enzyme-Immunoassay. *Eur J Microbiol Infect Dis* 9(3): 217-220, 1990.

35. Lollar R.H., Bankowski M.J.-Rush-Presbyterian-St.Lukes Medical Center, Chicago II, Abstract C-325 ASM, 1991.
36. Hossain A., Bakır T.M.F., Ramia S.: Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Tropical and Geographical Medicine*, 37(3): 250-257, 1985.
37. Tully J.G., Rose D.L., Whitcomb R.F., et al.: Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *J Infect Dis* 139: 478-482, 1979.
38. Jensen K.E., Senterfit L.B., Scully W.E., et al.: *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. An epidemiological appraisal in families treated with oxytetracycline. *Am J Epidemiol* 86: 419-432, 1967.
39. Smith C.B., Golden, C.A., Kanner R.E., et al.: Association of viral and *Mycoplasma pneumoniae* infections with acute respiratory illness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Resp Dis* 121:225-232, 1980.
40. Azimi, P.H., Chase P.A., Petru A.M.: *Mycoplasmas*: Their role in pediatric diseases. *Curr Probl Pediatr* 14:1-46, 1984.
41. Pönkä A.: Carditis associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Acta Med Scand* 206: 77-86, 1979.
42. Copps S.C.: Primary atypical pneumoniae with hemolytic anemia and erythema multiforme. *Clin Pediatr* 3: 491-495, 1964.
43. Feizi O., Grubb C., Skinner J.I., et al.: Primary atypical pneumoniae due to *Mycoplasma pneumoniae* complicated by haemorrhagic pleural effusion, haemolytic anemia and myocarditis. *Br J Clin Pract* 27: 99-101, 1973.

44. Boccardi V., D'Annibali S., Di Natale G., et al.: Mycoplasma pneumoniae infection complicated by paroxysmal cold hemoglobinuria with anti-P specificity of biphasic hemolysin. Blut 34: 211-214, 1977.
45. Feizi T.: Cold agglutinins the direct Coombs' test and serum immunoglobulins in Mycoplasma pneumoniae infection. Ann N Y Acad Sci 143: 801-812, 1967.
46. Ruhrmann G., Holthusen W.: Mycoplasma infection and erythromycin therapy in childhood, Scot Med J 22: 401-403, 1977.
47. Mardh P.A., Ursing B.: The occurrence of acute pancreatitis in Mycoplasma pneumoniae infection. Scand J Infect Dis 6: 167-171, 1974.
48. Fernald G.W., Glezen W.P.: Humoral and cellular immune responses to an inactivated mycoplasma pneumoniae vaccine in children. J Infect Dis 127: 498-504, 1973.
49. Smith C.B., Friedewald W.T., Chanock R.M.: Inactivated Mycoplasma pneumoniae vaccine. Evaluation in volunteers. JAMA 199: 353-358, 1967.
50. Jensen K.E., Senterfit L.B., Chanock R.M.: An inactivated Mycoplasma pneumoniae vaccine. JAMA 194:248-252, 1965.
51. Cassell G.H., Cole G.C.: Mycoplasmas as agents of human disease. N Eng J Med 304: 80-89, 1981.
52. Sasaki T., Bonissol C., Stoiljkovic B.: Cross reactive antibodies to Mycoplasmas found in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Microbiol Immunol 31: 521-530, 1986.

53. Räisänen S.M., Suni J.I., Leinikki P.O.: Serological diagnosis of mycoplasma pneumoniae infection by enzyme immuno-assay. J Clin Pathol 33: 836-840, 1980.
54. Cherry J.D., Welliver R.C.: Mycoplasma pneumoniae infections of adults and children. West J Med 125:47-55, 1976.
55. Hornsleth A.: Mycoplasma pneumoniae infection in infants and children in Copenhagen 1963-1965. Incidence of complement fixing antibodies in age groups 0-9 years. Acta Pathol Microbiol Scand 69: 304-313, 1967.
56. Suhs R.H., Feldman H.A.: Serologic epidemiologic studies with M.pneumoniae. II.Prevalence of antibodies in several populations. Am J Epidemiol 83: 357-365, 1966.
57. Jacobs E., Bennewitz A., Bredt W.: Reaction pattern of human anti-Mycoplasma pneumoniae antibodies in enzyme linked immunosorbent assays and immunoblotting J of Clin Microbiol 23 (3): 517-522, 1986.