

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA BAKTERİYEL ETKENLERİN VE  
BAZI DİRENÇ GENLERİNİN MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
İLE ARAŞTIRILMASI**

DR. ÖZLEM AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2013

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA BAKTERİYEL ETKENLERİN VE  
BAZI DİRENÇ GENLERİNİN MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
İLE ARAŞTIRILMASI**

DR. ÖZLEM AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

Danışman: DOÇ. DR. MEHMET ÖZDEMİR

KONYA, 2013

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Yrd. Doç. Dr. Bahadır FEYZİÖĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Metin DOĐAN'a, tez çalışmalarım sırasında emeği geçen biyolog Duygu Dalkılıç'a, tezimi 1215180030 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji labaratuvarı teknisyen ve personeline, asistanlığım süresince yanımda olan ve tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen eşim Yrd. Doç. Dr. Yusuf Aydemir ve çocuklarıma, en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

# ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINDA BAKTERİYEL ETKENLERİN VE BAZI DİRENÇ GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI

ÖZLEM AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

KONYA-2013

**Amaç:** Alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların solunum yolu örneklerinde multipleks PZR ile bakteriyel etkenlerin saptanması, CTX-M, NDM ve mecA direnç genlerinin tespiti ve multipleks PZR'in etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Eylül 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında akut alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Numune Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerine başvuran, toplum kaynaklı pnömoni, KOAH alevlenmesi ve bronşiektazi akut alevlenmesi tanısı konulan, ayaktan veya yatırılarak tedavi edilen, 197 hasta çalışmaya alındı. Hastalardan alınan örnekler, eş zamanlı olarak koyun kanlı agar, çikolata agar ve EMB agara ekilerek kültür işlemine alındı. Bakteri tip tanımlaması, Vitek2 (Biomerieux) tam otomatik tanımlama sistemi ile yapıldı. Moleküler olarak bakterilerin amplifikasyonu, deteksiyonu ve direnç genlerinin tespiti moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında CAP-Bac-PN Mix (Gen ID®; Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı.

**Bulgular:** Kültür yöntemi ile tüm olguların 62'sinde (% 31,5) en az bir bakteri üremesi saptanırken bu sayı multipleks PZR ile 125'e (% 63,5) yükseldi. PZR de en çok saptanan bakteriler sırasıyla; *S.pneumoniae* (% 32), *H.influenzae* (% 31) oldu. Çoklu etken saptama oranları açısından PZR ile kültür arasında anlamlı farklılık vardı ( $p<0.005$ ). Kültürde sadece 2 olguda çoklu bakteri saptanırken, PZR'da 47 olguda çoklu etken saptandı. PZR yöntemi ile CTX-M, NDM ve mecA direnç geni saptanamadı.

**Sonuç:** Alt solunum yolu enfeksiyonlarında; kültür, seroloji gibi konvansiyonel yöntemler etkeni saptamada her zaman yeterli olamamaktadır. Bu nedenle, Moleküler testler gibi yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Multipleks PZR testleri hızlı ve duyarlı testlerdir. PZR testlerinin kullanımı, bakterilerin ve enfeksiyonun hızlı tanısını sağlar. Tanısal testlerin kombine kullanımı, tanının hızlı konmasını sağlayarak antibiyotik direncinde azalmaya katkıda bulunur.

**Anahtar kelimeler:** Alt solunum yolu, enfeksiyon, multipleks PZR, kültür

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF BACTERIAL PATHOGENS AND RESISTANCE GENES IN THE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

ÖZLEM AYDEMİR

KONYA-2013

**Objective:** It was aimed to determine the bacterial pathogens and CTX-M, NDM, mecA resistance genes by multiplex PCR in the respiratory tract samples of the patients in community acquired lower respiratory tract infections and evaluate the efficiency of multiplex PCR.

**Methods:** One hundred ninety seven patients admitted to the Chest Diseases outpatient at the Faculty of Medicine of Necmettin Erbakan University and outpatient clinics of Konya Numune Hospital with the symptoms of acute lower respiratory tract infection, and diagnosed with community-acquired pneumonia, acute exacerbation of COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) and exacerbations of bronchiectasis were included in the study between September 2011 and April 2013. The respiratory samples taken from patients were inoculated into the sheep blood agar, chocolate agar, and EMB agar synchronously and were cultured. Bacterial type identifications were performed with fully automated identification (Vitek2, Biomerieux, France) system. Molecular amplification, detections of the bacteria and resistance genes were performed using CAP-Bac-PN Mix kit (Gene ID ®; Autoimmun Diagnostika GmbH, Germany).

**Results:** At least one bacterial growth was determined in 62 (31.5%) of all patients with culture method. This number increased to 125 (63.5%) with multiplex PCR. The bacterie which were most commonly identified by PCR were *S. pneumoniae* (32%) and *H. influenzae* (31%). There was a significant difference between PCR and bacterial culture system in terms of multi-factor detection rates ( $p < 0.005$ ). Multiple bacteria were detected only 2 cases in culture method but multiple pathogens were detected in 47 cases with PCR method. CTX-M, NDM and mecA genes were not detected with PCR.

**Conclusion:** Conventional methods, such as culture and serology are not always adequate to detect in lower respiratory tract the pathogens. For this reason, new diagnostic methods such as molecular tests were necessary. Multiplex PCR tests are sensitive and rapid tests. Use of PCR, provide rapid identification of bacteriae and diagnosis of infection. Use of combination of diagnostic tests will be resulted rapid diagnosis and contribute to a reduction in antibiotic resistance.

**Key Words:** Lower respiratory tract, infection, multipleks PCR, culture

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Alt solunum yolu enfeksiyonları.....	4
2.1.1 Toplum kökenli pnömoni.....	4
2.1.2 Kronik obstruktif akciğer hastalığı akut alevlenmesi (KOAHA).....	6
2.1.3 Bronşiektazi.....	7
2.2 Alt solunum yolu enfeksiyonlarındaki bakteriyel etkenler:.....	8
2.2.1 <i>Streptococcus Pneumoniae</i> .....	8
2.2.2 <i>Haemophilus influenzae</i> .....	9
2.2.3 <i>Moraxella catarrhalis</i> .....	10
2.2.4 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	10
2.2.5 <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	11
2.2.6 <i>Legionella pneumophila</i> .....	12
2.2.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	13
2.2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
2.3 Bakteriyel direnç genleri.....	14
2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	16
2.4.1 Multipleks PZR.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ.....	53
7. KAYNAKLAR.....	55

## TABLÖLAR

**Tablo 4.1.** Çalışmaya alınan hastaların genel özellikleri

**Tablo 4.2.** Kültür ile saptanan mikroorganizmaların dağılımı

**Tablo 4.3.** Klinik tanıya göre kültürde saptanan mikroorganizmaların dağılımı .

**Tablo 4.4.** Kültürde üreme ile çeşitli parametrelerin ilişkisi

**Tablo 4.5.** PZR analizi ile tespit edilen patojenlerin dağılımı

**Tablo 4.6.** Klinik tanıya göre PZR ile saptanan mikroorganizmaların dağılımı

**Tablo 4.7.** PZR'da bakteri saptanması ile çeşitli parametrelerin ilişkisi

**Tablo 6.1.** ASYE hastalarının solunum örneklerinde PZR ve kültür ile etken saptanma oranları

**Tablo 6.2.** ASYE hastalarının solunum örneklerinde PZR yöntemi ile atipik bakteri saptanma oranları

## ŞEKİLLER

**Şekil 4.1.** Klinik tanıya göre kültürde bakteri üreme oranları

**Şekil 4.2.** Örnek çeşidine göre kültürde bakteri saptanma oranları

**Şekil 4.3.** Çocuk ve yetişkin hastalarda kültürde üreyen bakterilerin dağılımı

**Şekil 4.4.** Klinik tanıya göre PZR'de bakteri saptama oranları

**Şekil 4.5.** Örnek türüne göre PZR'da bakteri saptanma oranları

**Şekil 4.6.** Çocuk ve yetişkin hastalar arasında PZR'da saptanan bakterilerin dağılımı

**Şekil 4.7.** Etken saptanma oranları açısından PZR ve kültürün karşılaştırılması.

**Şekil 4.8.** Saptanan etkenler açısından PZR ve kültürün karşılaştırılması

**Şekil 4.9.** PZR de çoklu saptanan bakterilerin dağılımı



## KISALTMALAR

**ASYE:** Alt solunum yolu enfeksiyonu

**TKP:** Toplum kökenli pnömoni

**HKP:** Hastane kökenli pnömoni

**PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**BAL:** Bronkoalveoler lavaj

**KOAH:** Kronik obstruktif akciğer hastalığı

**KOAHAA:** Kronik obstruktif akciğer hastalığı akut alevlenmesi

**NFS:** Nazofaringeal sürüntü

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE), dünyada en sık görülen ve en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalığıdır. WHO verilerine göre enfeksiyon kaynaklı ölümler arasında 1. sırada, tüm ölümler arasında ise 3. sırada yer almaktadır (WHO 2004). ASYE genel olarak, akut bronşit, kronik bronşitin akut alevlenmeleri, bronşiektazi akut alevlenmeleri ve pnömonileri kapsamaktadır. Pnömoniler ise, toplum kökenli (TKP), hastane kökenli (HKP) ve bağışıklığı baskılanmış hastalardaki pnömoniler olarak sınıflandırılır.

ASYE'lerinin en az yarısından bakteriler sorumlu iken, yaklaşık olarak üçte birinden ise virüsler ve atipik bakteriler sorumludur. Tüm solunum sistemi enfeksiyonlarında en sık izole edilen patojenler, solunum bakterileri olarak da adlandırılan *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'dir (Akın 2011). Son yıllardaki tanısal gelişmeler ile *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ve *Mycoplasma pneumoniae* gibi atipik bakterilerin de solunum yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olduğu gösterilmiştir (Özlu 2007).

ASYE'leri özellikle gelişmekte olan ülkelerde morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Bu ülkelerde her yıl 150 milyondan fazla çocuk pnömoni tanısı almaktadır. Dünya genelinde her yıl 11-20 milyon çocuğun pnömoni nedeniyle hastaneye yatırıldığı ve yaklaşık 2 milyondan fazlasının yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir. Dünya sağlık örgütünün 2011 yılı raporuna göre 5 yaş altında her yıl gerçekleşen 7 milyon ölümün %17,5'inden solunum yolu enfeksiyonları sorumludur. (WHO 2011)

Sağlık Bakanlığı 2004 yılı sağlık istatistikleri gözden geçirildiğinde, tüm hastane yatışlarının %1,9'unu pnömoni hastalarının oluşturduğu dikkati çekmektedir (TÜİK 2004). Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yılda yaklaşık 4 milyon kişide TKP oluştuğu ve bunların 600.000 kadarının hastanede tedavi gerektirdiği tahmin edilmektedir. Yaşla birlikte insidans artmaktadır. Finlandiya' da yapılan bir çalışmada her 1000 kişide yıllık insidans 16-59 yaş grubunda 6, 60-74 yaş grubunda 20, 75 yaş ve üstü yaş grubunda ise 34 olarak bildirilmiştir.

Ülkemizde ASYE'leri, ölüm nedenleri arasında % 4,2 ile beşinci sırada yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı'nın 2004 yılı istatistikleri incelendiğinde, bir yıllık dönemde hastanede gerçekleşen ölümlerin % 1,8'inin pnömonilere bağlı olduğu bildirilmiştir (TÜİK 2004).

ASYE tedavisinde etyolojik etkenin doğru tesbit edilmesi ve antimikrobiyal tedaviye erken başlanması oldukça önemlidir. Tedaviye başlamada 4-8 saatlik gecikmenin mortaliteyi artırdığı gösterilmiştir (Houck 2004). Buna rağmen konvansiyonel tanı yöntemleri çoğu zaman etyolojik tanıda yetersiz kalmakta ve klinisyenler hemen daima ampirik antibiyotik tedavi başlamaktadır.(She 2010, Musher 2013)

Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalara genel olarak bakıldığında etyolojik ajan saptama oranlarının ortalama % 22- 35,8 civarında seyrettiği görülmektedir (Kurutepe 2012).

Alt solunum yolu enfeksiyonu vakalarında, uygun antibiyotik tedavisi seçmek için enfeksiyona neden olan patojeni tespit etmek gereklidir. Günümüzde kültür, bakteriyel etkenlerin tanısında altın standart olmasına rağmen bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar arasında; kültür ortamının seçiciliği nedeniyle birden fazla bakterinin üremesinin engellenmesi, etkenin üretilmesinde ve yorumlanmasında zorluklar, farklı etkenler için farklı besiyerleri kullanma gerekliliği, özellikle antibiyotik kullanan hastalarda sensitivite ve spesifitesinin düşük olması ve sonuçlar için kültürde en az 2 güne ihtiyaç olması sayılabilir.

Bu nedenle daha çabuk sonuç veren ve zor üreyen bakterileri de saptayabilen tanı testlerine ihtiyaç duyulmuştur. Moleküler teknikler, solunum yolu enfeksiyonlarının laboratuvar tanısının hızını ve duyarlılığını artırmak için büyük potansiyele sahiptir. Son yıllarda alt solunum yolu enfeksiyonlarında da güvenilirliği gösterilmiş bir moleküler tanı yöntemi olan PCR'in kullanımı giderek artmaktadır (Murdoch 2005). PCR yönteminin kültüre göre en belirgin avantajları; çok az miktardaki mikroorganizmanın DNA veya RNA'sının çoğaltılmasına dayanan bir yöntem olması nedeniyle canlı organizmaya ihtiyaç duymaması ve böylelikle antibiyotik kullanımından etkilenmemesi, çoklu mikroorganizmaların gösterilmesinde daha duyarlı oluşu ve hızlı sonuç vermesidir. (Templeton 2005, Abdeldaim 2010) Solunum yolu örneklerinde *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.pneumoniae* ve *C.pneumoniae* ve diğer sık görülen bakterilerin eş zamanlı olarak tanımlanması için multipleks PZR geliştirilmiştir. Kültür ile karşılaştırıldığında PZR ile bakteri tespit edilme oranı oldukça yüksek bulunmuştur (Kurutepe 2012). Ayrıca PZR ile mikst enfeksiyonlarda ve önceden antibiyotik kullanmış hastalarda da etkenler izole edilebilmektedir.

*C.pneumoniae* ve *M.pneumoniae* gibi atipik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tanısı genellikle serolojik yöntemlerle yapılır. Fakat serolojik sonuçların alınması uzun süreler almakta ve hastalığın erken dönemlerinde yanlış negatif test sonuçları sık görülmektedir. Oysa

yeni geliştirilen nükleik asit amplifikasyon teknikleri ile doğrudan solunum yolu örneklerinde *C.pneumoniae*, *M.pneumoniae* ve *Legionella* 'nın hızlı ve hassas tespiti mümkün olmaktadır.

Ampirik antibiyotik başlanmasında o toplumda, alevlenmelerdeki mikrobiyolojik ajanların sıklığını ve direnç özelliklerini bilmek, akılcı antibiyotik seçimi ve tedavi başarısı için gereklidir. Bu yüzden ülkesel ve bölgesel olarak, çok sayıda kültür ve serolojik temelli etkene yönelik çalışmalar yapılmış ve bunlar ampirik tedavinin temelini oluşturmuştur.

Bu çalışmada; alt solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan bakteriyel etkenlerin saptanmasında PZR ve konvansiyonel yöntemlerin karşılaştırılması, bölgemizdeki enfeksiyon etkenlerinin prevalansının saptanması ve PZR ile direnç genlerinin saptanarak ampirik antibiyotik tedavisine rehber oluşturulması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER:

### 2.1. Alt solunum yolu enfeksiyonları:

#### 2.1.1. Toplum kökenli pnömoni:

Pnömoni, terminal bronşiyollerin distalindeki akciğer parankimine inhalasyon, aspirasyon veya hematojen yollarla ulaşmış patojen mikroorganizmaların yol açtığı akut bir enfeksiyon hastalığıdır. Klinik ve radyolojik olarak akciğer dokusunun belirli bir alanında, bazen bir veya daha fazla lobunda konsolidasyon bulgularının varlığı şeklinde tanımlanabilir (File 2003). Toplum ve hastane kökenli pnömoni olmak üzere iki gruba ayrılır.

Toplum kökenli pnömoniler (TKP), bilinen bir immün yetmezliği olmayan kişide, günlük yaşamı sırasında gelişen veya bir başka deyişle, hastane dışında ortaya çıkan pnömonilerdir (File 2003).

TKP, tüm dünyada hekim başvurularının, tedavi giderlerinin, iş-okul günü kayıplarının ve ölümlerin önemli bir kısmından sorumludur. Avrupa'da yıllık insidans %0,5-1,1 olarak bildirilmektedir (BTS 2001). Yaşla birlikte insidans artmaktadır. Pnömonide yoğun antibiyotik kullanımına rağmen ölüm oranları oldukça yüksektir. İngiltere ve ABD'de tüm ölümlerin altıncı, enfeksiyöz kaynaklı ölümlerin birinci nedeni pnömonilerdir. Mortalite, ayaktan tedavi edilenlerde %1-5, hastanede tedavi edilenlerde % 12, yoğun bakım hastalarında % 40 civarındadır.

#### Etyoloji:

TKP'de bakteriyolojik tanı olguların yaklaşık yarısında mümkün olabilmektedir. Tüm çalışmalarda *S.pneumoniae* en sık rastlanan etken olma özelliğini devam ettirmektedir. İleri yaş, sigara, malnütrisyon, konjestif kalp yetmezliği gibi eşlik eden risk faktörleri varlığında pnömokoksik pnömoni riski belirgin olarak artmaktadır. Yine TKP olgularının % 3-15'inde *H.influenzae* etyolojik ajan olarak rastlanmaktadır. Özellikle KOAH'lı hastalarda gelişen TKP olgularında bu etkene sık olarak rastlanmaktadır. *M.pneumoniae* ve *C.pneumoniae* sırasıyla % 0-30 ve % 2-3 olarak bildirilmektedir. Laboratuvar olanaklarının artmasıyla bu etkenlerin saptanma sıklığı da artmaktadır. *S. aureus* TKP'lerin % 2-5'inden sorumludur. Yine bu etkenler dışında *M.catarhallis*, *K. pneumoniae* ve diğer gram negatif basiller, *Legionella* türleri ve virüslerde TKP etyolojisinden sorumludurlar.

**Laboratuvar tanı:**

Pnömonili olgularda balgam materyalinin Gram boyaması ve kültürü etken mikroorganizmayı belirlemek ve uygun antibiyotik seçimi için çok önemlidir. Ancak, özellikle yaşlı ve çocuk hastalar yeterli ve uygun balgam örneği veremez (Cunha 2004). Doğrudan ekspektorasyonla örnek alınamıyorsa, hipertonic tuzlu su ile indüksiyon veya postür al drenaj uygulanabilir. Balgamın mikrobiyolojik inceleme için uygunluğu değerlendirilmelidir. Bunun için küçük büyütme objektifinde (x10) yapılan incelemede, her alanda yassı epitel hücre sayısının 10'un altında, lökosit (PNL) sayısının 25'in üzerinde olması durumunda balgamın kaliteli olduğu kabul edilir (Niederman 2001). Gram boyamasında baskın mikroorganizma görülmesi klinik destekleme açısından yol göstericidir. *Legionella spp*, *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae* enfeksiyonlarında hâkim mikroorganizma görülmez veya az sayıda mikroorganizma mevcuttur. Gram boyaması sonuçlarıyla uyumlu kültür pozitifliği tanıyı koymada ve antibiyotik seçiminde yararlı olabilir (Niederman 2001).

**Tedavi:**

Pnömonide mortaliteyi azaltmadaki en önemli faktör tedaviye erken başlamaktır. Hastaneye yatırılan hastalarda ilk sekiz saat içinde uygun antibiyotik tedavisine başlamanın mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (Niederman 2001). Tedavide uygun antimikrobiyal ajan seçim kararı; anamnez ve klinik özelliklere dayanan ampirik yaklaşımla verilir.

Etken mikroorganizmaya göre değişmekle beraber, genel olarak hastanın ateşinin düşmesinden bir hafta sonrasına kadar tedaviye devam edilmelidir. Ortalama tedavi süreleri, pnömokoksik pnömonide 7-10 gün, Mikoplazma ve Clamidya pnömonilerinde 14 gün, Legionella pnömonisinde 14-21 gündür. Ağır pnömonili olgularda eğer etken saptanamamışsa tedavi süresi üç haftadan az olmamalıdır (Niederman 2001).

### 2.1.2. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı akut alevlenmesi (KOAHA):

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), başta sigara olmak üzere zararlı partikül ve gazlara karşı akciğerlerde gelişen anormal inflamatuvar yanıtla ilişkili, bütünüyle geri dönüşü olmayan, ilerleyici hava akımı kısıtlanmasıyla karakterize bir hastalıktır. Önemli bir kronik morbidite ve mortalite nedenidir. KOA nedeni ile ortalama her yıl 3 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (Klaus 2007).

KOA'da akut alevlenme; günlük değişimlerin ötesinde ve tedavi gerektirecek düzeyde, nefes darlığı, balgam miktarı ve pürülansında artma olarak tanımlanmaktadır (GOLD 2011). Hastalığın seyri sırasında yılda ortalama 1-3 arasında alevlenme olmaktadır. KOA evresi ilerledikçe alevlenme sıklığında ve şiddetinde artma görülmektedir (Klaus 2007). En sık görülen alevlenme nedenleri trakeabronşiyal enfeksiyonlar (bakteriyel, viral) ve hava kirliliğidir. Alevlenme tedavisinin etkinliği açısından etkenin tesbit edilmesi önemlidir (Klaus 2007, Rodriguez-Roisin 2000). Alevlenmelerin %50-60'ı enfeksiyon kaynaklıdır. Kronik sigara dumanına maruz kalmak hava yolu savunma mekanizmalarında hasar oluşturur, mukosilier klirensi bozar, mukus vizkozitesini artırır. Bunun sonucunda, distal hava yollarında bakteriyel kolonizasyon gelişir. Kolonize olan bakteriler mukus üretimini stimüle eder, epitelyal hücreleri hasarlandırır, sililerin vuru sıklığını azaltır ve immün sistem hücre fonksiyonlarını bozar. Bakteriyel proteazlar lokal immunglobinlerde hasar meydana getirir ve aynı zamanda inflamatuvar hücreleri bu bölgeye toplar. Proteazlar ve toksik oksijen radikalleri epitelyal tabaka hasarını daha da artırır. Bakteriyel kolonizasyon da hava yolunu hasara uğratarak inflamasyonun ve bakteriyel kolonizasyonun daha da yoğunlaşmasına neden olur ve böylece bir kısır döngü meydana gelir (Sherk 2000).

Stabil KOA'lı hastalarda alevlenmeler, savunma mekanizmalarındaki yetersizlik sonucu endojen mikroorganizma artışına bağlanır. Alevlenme dönemi ile stabil hastaların karşılaştırıldığı çalışmalarda, bakteri tespit edilen hasta sayısı 2 kat, kültürlerde bakteri yükü ise 5 kat daha fazla bulunmuştur (Miravittles 2002)

İnfeksiyon nedenli alevlenmelerin %40-50'si bakteriyel, %30'u viral, %5-10'u atipik bakteri kökenlidir; %10-20'sinde ise birden fazla patojen bulunmaktadır. Bakterilerden en sık saptananlar *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *M. catarrhalis*'tir. Rinovirüsler başta olmak üzere influenza, parainfluenza ve koronavirüsler genellikle alevlenmelerden sorumlu virüslerdir (Wedzicha 2002). Alevlenmelerin bakteriyel enfeksiyona bağlı olup olmadığını anlamada, en

yararlı inceleme balgamın Gram boyamasıdır. Pürülan balgamlı hastalarda Gram boyamada bakteri sayısının belirgin şekilde artması, nötrofil sayısının da stabil döneme göre en az iki kat artış göstermesi, bakteriyel enfeksiyonu destekler (Wedzicha 2002).

### **2.1.3.Bronşiektazi:**

Bir veya birden fazla bronşta patolojik olarak ortaya çıkan ve genellikle bronş duvarında kalınlaşma ile beraber görülen geri dönüşümsüz bronşiyal dilatasyonlar, bronşiektazi olarak adlandırılır. Genellikle, çocukluk çağında geçirilen, nekrotizan ve/veya pürülan akciğer enfeksiyonları sonrası, bronş duvarında yoğun inflamasyon ve destruksiyonun ardından gelişir. (Pappalettera 2009). Etiyolojik ajanlar arasında; adenovirüs, kızamık ve kabakulak virüsü, *K.pneumoniae*, *S.aureus* ve anaerob bakteriler gibi bakteriyel etkenler bildirilmiştir (Angrill 2002).

Gelişmekte olan ülkelerde bronşiektazi önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Ülkemizde de halen önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Klinik olarak bu hastalarda, kronik öksürük, bol mukopürülan balgam ve sık tekrarlayan enfeksiyonlar görülür. Çoğu zaman balgamlı öksürüğün en az 4 hafta veya daha uzun süre devam ettiği durumlarda akla getirilmelidir (Pappalettera 2009).

Sağlıklı kişilerde alt solunum yolları tamamen steril iken bronşiektazili kişilerde alt solunum yolları sıklıkla patojenik mikroorganizmalarla kolonizedir. Bronşiektazide esas olay; mukosilier klirensin bozulmasıdır. Bu durum mukus ve mikroorganizmaların bronşlarda normalden daha uzun süre kalmalarına yol açmaktadır. Bazı mikroorganizmaların toksinlerinin, siliyer fonksiyonları ve mukus transportunu inhibe edici, mukus sekresyonunu uyarıcı etkisi vardır. Bu durum mukosiliyer klirensi daha çok bozar ve mikroorganizmalar bronşlarda kolonize olmaya başlar. Bu kolonizasyon epizodik enfeksiyöz ataklara sebep olabilir. Başlıca kolonize olan mikroorganizmalar olarak vakaların % 47-55'inde *Haemophilus* türleri ve % 18-26'sında *Pseudomonas* türleri saptanmıştır (Angrill 2002).

En sık görülen semptomları; kronik öksürük, balgam çıkarma, hemoptizi ve nefes darlığıdır. Öksürük tekrarlayıcı ve devamlı prodüktif özellik gösterebilir. Kolonize bronş tıkaçlarının neden olduğu enfeksiyon ataklarında; ateş, öksürük, balgam miktarında artış ve nefes darlığı ortaya çıkar. Bronşiektazinin bu alevlenme dönemlerinde en sık dispne görülür (Angrill 2002).



## 2.2. Alt solunum yolu enfeksiyonlarındaki bakteriyel etkenler:

### 2.2.1. *Streptococcus pneumoniae*:

#### **Laboratuvar tanı:**

**Mikroskopi:** Pnömonokok enfeksiyonlarının tanısı için örneklerin Gram boyaması yapılır. Prensipte olarak örnekler antibakteriyel ilaç verilmeden önce incelenmelidir. Mikroorganizma tipik olarak uzamış gram pozitif koklar şeklinde görülür (lanset şeklinde diplokok). Özellikle eskimiş kültürlerde iyi boyanmadığından gram negatif gibi görülebilir. Gram boyama quellung ile konfirme edilmelidir. Quellung testinde polivalan antikapsül antikorları bakteri ile karıştırılır ve karışım mikroskopik olarak incelenir. Bakteri etrafında ışık kırılması olmayan bölgenin daha da genişlemesi pozitif reaksiyonu gösterir (Murray 2009).

**Kültür:** Balgam örnekleri, zenginleştirilmiş ve kan eklenmiş nutrient besiyerine ekilmelidir. Pnömonili hastaların yaklaşık yarısında *S.pneumoniae* üretilir. Çünkü mikroorganizmanın besinsel gereksinimleri kompleksdir ve oral floradaki hızlı üreyen mikroorganizmalar tarafından üremeleri inhibe olur (Murray 2009).

**Nükleik asit temelli testler:** Solunum sistemi enfeksiyonlarının etyolojik tanısında PZR çalışmalarının tarihi çok eski değildir ve son yıllarda bir artış görülmektedir. PZR çok düşük miktarlardaki DNA ya da RNA'yı sınırsız sayıda çoğaltmaya yarayan hızlı ve duyarlı bir tanı yöntemidir (Curran 2007). Bu tekniğe ilginin artmasının nedeni tanı oranının çok yüksek olmasıdır. Grainer ve arkadaşları gerçek zamanlı PZR ile 195 çocuğun nazofarengeal sekresyonlarında *S.pneumoniae*'nin kantitatif tespitini yapmışlar ve PZR'nin sensitivitesini %100, spesifitesini % 96 bulmuşlardır (Grainer 2001). Curran ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada otuz olgudan alınan balgam örneklerinin PZR sonuçları, kültür sonuçları ile karşılaştırılmış ve PZR ile saptanma oranları oldukça yüksek bulunmuştur (Curran 2007). Bu yöntemlerin en önemli iki avantajı; bu yöntemin duyarlılığının kültüre göre daha yüksek olması, daha hızlı sonuç elde edilmesidir (Curran 2007).

**Antijen saptama:** Pnömonokok C polisakariti idrarla atılır ve ticari olarak bulunan immunassay ile saptanabilir. Duyarlılığı pnömonokok pnömonisi nedeniyle bakteriyemisi olan hastalarda %70 olarak bildirilirken özgüllüğü düşüktür. Menenjitli hastalarda BOS da çalışılırsa özgüllük %100'e çıkar (Murray 2009).

### 2.2.2. *Haemophilus influenzae*:

#### **Laboratuvar tanı:**

**Mikroskopi:** Eğer mikroskopi dikkatle yapılırsa duyarlılığı ve spesifitesi yüksektir. Şekil olarak kokobasilden uzun pleomorfik filamentlere kadar değişen gram negatif çomaklar tespit edilebilir. Gram boyama özellikle alt solunum yolu hastalıklarının tanısında faydalıdır.

**Kültür:** Bakterinin üretilmesi için klinik örnekler hastalara antibiyotik verilmeden alınmalı, hızla laboratuvara ulaştırılmalıdır. Kan, BOS ve diğer vücut sıvıları çikolatamsı agar besiyerine ekilmelidir. Eğer çikolatamsı agar hazırlık aşamasında çok ısıtılırsa V faktörü tahrip olur. Bakteriler 35-37 °C' de, %3-5 CO<sub>2</sub> li ortamda 24 saatlik inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında, düz, opak koloniler oluşturur. Koloniler ısıtılmamış kanlı agarda *S. aureus* kolonilerinin etrafında üremiş küçük koloniler olarak tespit edilebilir (satellite-uydu fenomeni).

**Moleküler tetkikler:** Son yıllarda daha sensitif, spesifik, erken ve hızlı tanı koyduracak nükleik asit temelli testler geliştirilmiştir. Bu metotların duyarlılığı ve özgülüğü oldukça yüksektir (Marty 2004).

**Antijen tespiti:** *H.influenzae* antijeninin, spesifik olarak poliribitolfosfat kapsüler antijeninin immünolojik tespiti, *H.influenzae* tip b hastalığının tanısı için hızlı ve duyarlı bir yoldur. Antijen BOS ve idrarda tespit edilebilir. Bu test sadece aşı programının uygulandığı ülkelerdeki serotip b tespit edebildiği için oldukça sınırlı bir kullanıma sahiptir (Murray 2009).

### 2.2.3. *Moraxella catarrhalis*:

#### **Laboratuvar tanı:**

*M.catarhallis*'e bağlı alt solunum yolu enfeksiyonlarında, balgam örneklerinin gram boyalı yaymaları incelendiğinde, bol lökosit, fazla sayıda gram negatif diplokokların bulunması tanı için önemlidir. Kültürde seçici besiyerlerinde iyi ürerler. Koloniler, oksidaz ve katalaz pozitifdir. *M.catarhallis*'i diğer *Neisseria* türlerinden ayırt etmek için kullanılan oldukça hızlı ve güvenilir indoksil-bütirat hidroliz spot testi tanımlanmıştır ve ticari olarak bulunmaktadır. *M.catarhallis*'i izole eden nükleik asit temelli ticari kitler bulunmaktadır.

#### 2.2.4. *Mycoplasma pneumoniae*:

##### **Laboratuvar tanı:**

**Mikroskopi:** Tanısal değeri yoktur. Mikoplasmalar hücre duvarına sahip olmadıklarından zayıf olarak boyanırlar.

**Kültür:** Boğaz yıkantılarından, bronş lavajı veya balgamdan izole edilebilirler. Örnekler, serum, maya ekstresi, glikoz, bir pH indikatörü ve penisilin içeren özel besiyerine inoküle edilmelidir. *M.pneumoniae*, yavaş üreyen bir mikroorganizmadır. Besiyerinde, *M.pneumoniae* kolonileri 5-14 gün sonunda görülmeye başlar. En iyi koşullarda bile kültürle izolasyon 2-3 haftayı bulur; bu durum, enfeksiyonun erken döneminde mikroorganizmayı saptayıp, tedaviyi yönlendirmeye yardımcı olacak tanısal yöntemlere gereksinim olduğunu gösterir (Baum 2000). Kültür pozitifliği hastalığın kesin bir kanıtı olsa da duyarlılığı düşüktür (Murray 2009). Yapılan bir çalışmada serolojisi pozitif bulunan hastaların kültürlerinin sadece %64' ü pozitif olarak sonuçlanmıştır.

**Spesifik antikor tayini:** İmmunofloresan, presipitasyon, büyüme inhibisyonu, indirekt hemaglutinasyon, mikoplasmasidal antikor, kompleman fiksasyon, ELISA, adherans inhibisyonu, radioimmünopresipitasyon, radioimmunoassay *M.pneumoniae* tanısında serum antikorlarını ölçmek için kullanılabilirler. Tek yüksek titreler (>1:256) genellikle yakın geçmişteki enfeksiyonu belirler, nadiren kesin *M.pneumoniae* enfeksiyonunu gösterir. *M.pneumoniae* enfeksiyonları, uzun bir inkübasyon dönemini takiben oluşur ve antikor oluşumu akut hastalık sırasında anlamlı düzeylere erişir. Akut dönemde 5-7 gün ara ile alınan serum örneklerinde, antikor titresinde 4 kat artış saptanırsa tanı kesinleşir.

**ELISA:** ELISA ile IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar saptanır. *M.pneumoniae* enfeksiyonu sırasında; IgM, hastaların yaklaşık %80'inde 1. haftada pozitifleşmekte ve 10-30. günlerde en yüksek düzeylere ulaşmaktadır. Spesifik IgM'in tespitinde, ELISA yönteminin duyarlılığı %90,5 ve özgüllüğü de %93,2 olarak (Öztürk 2000, Ertem 2002).

**Soğuk aglutinasyon testi:** Hastalığa özgül değildir ve pnömonili hastaların %30-50'sinde pozitif bulunur. Yine de 1/32 ve üzerindeki titreler anlamlıdır (Jacobs 1993).

**Moleküler yöntemler:** Atipik bakterilerin hızlı tespiti için PZR gibi yeni moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin sensitivite ve spesifitesi, serolojik yöntemlerle eşit

veya daha yüksektir (Boman 1999, Dorigo-Zetsma1999). Bu yöntem sayesinde çok az bir numune ile birden fazla patojen aynı anda saptanabilmektedir (Edwards 1994). Klinik tanı laboratuvarlarında multipleks PZR yöntemleri alternatif hale gelmiştir ( Hayden 2001).

### 2.2.5. *Chlamydia pneumoniae*:

#### **Laboratuvar tanı:**

Tanı, organizmanın izolasyonu, serolojik incelemeler ve nükleik asit araştırma yöntemlerine dayanmaktadır. *C.pneumoniae*, tüm klamidya türleri arasında izolasyonu en zor olanıdır. İzolasyonu için en uygun örnekler nazofaringeal sürüntüler ve bronkoalveoler lavaj sıvısıdır. Organizma ayrıca balgam ve plevral kültüründen de üretilebilir. *C.pneumoniae*; HeLa 229, HL, NCI-H 292 ve Hep-2 hücrelerinde üretilebilir (Koneman 1997).

**Seroloji:** Bakterinin izolasyonunun güç olması nedeniyle, enfeksiyon tanısında serolojik incelemelere daha çok başvurulmaktadır. Bu amaçla en güvenilir test mikroiimmunfloresans (MİF) testidir. MİF, cinse özgü antijenleri içermeyen, sadece türe ve türler arasındaki serovarlara ait antijenleri kapsayan, özgül ve duyarlı testlerdir. Primer enfeksiyonda, hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra IgM antikorları, 6-8 hafta sonra da IgA ve IgG antikorları ortaya çıkar. Akut *C. pneumoniae* tanısı için kriter ya tek bir  $\geq 1:16$  IgM titresini veya IgG titresinde 4 kat yükselmedir. Tek bir yüksek Ig G titresini kullanılamaz. İnfeksiyondan 6-8 haftaya kadar IgG antikorları oluşmadığı için akut enfeksiyonun serolojik tanısında testin değeri düşüktür (Ertem 2002).

**ELISA:** ELISA yöntemi de *C.pneumoniae* tanısında kullanılan yöntemlerdendir. Testin sensitivitesi yapılan çalışmalarda %70 ile %100 arasında değişmektedir. MIF ile karşılaştırmalı yapılan çalışmalarda sensitivite benzer bulunmuştur. Ancak testin spesifitesi daha düşüktür. Kültür ile karşılaştırıldığında %57 olarak bulunmuştur. Bazı araştırmacılar spesifiteyi arttırmak için ELISA ile pozitif çıkan örneklerin, direkt immunofloresan yöntemi ile incelenmesini önermişlerdir, ancak bu da maliyeti arttırmaktadır (Numazaki 2000).

**Moleküler yöntemler:** Özellikle izolasyonunun güç olması ve bazı hastalarda serolojik yanıtın geç ortaya çıkması veya hiç oluşmaması nedeniyle, PZR ile hastalığın erken ve hızlı tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Ertem 2002, Kuoppa 2002).

## 2.2.6. *Legionella pneumophila*:

### **Laboratuvar tanı:**

**Mikroskopi:** Gram boyama ile zayıf boyanırlar, bu nedenle dieterle gümüş veya gimenez boyası kullanılabilir. Klinik örneklerde bakteriyi mikroskopik olarak tanımanın en duyarlı rolü, doğrudan floresanla işaretli monoklonal ve poliklonal antikorları içeren direkt florasan antikor (DFA) testinin kullanımındır. Bu testin duyarlılığı da (%20-75) düşüktür (Tünger 2005).

**İdrarda antijen arama testi:** Enfekte hastaların idrarlarından atılan çözünür haldeki *Legionella* serogrup 1'e spesifik lipopolisakkarit antijenlerini saptamak için kullanılır. Bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (%60-90), ancak diğer serogruplarda kullanılmaz (Tünger 2005, Murray 2009). Antijen tedaviden haftalar veya aylar sonrada pozitif olarak bulunabilir.

**Kültür:** Testin duyarlılığı %80-90'dır. Kültür için en sık L-sistein içeren buffered charcoal yeast extract agar (BCYE) besiyeri kullanılır. %3-5 CO<sub>2</sub> li ortamda 35 °C'de 3-5 günde üreyebilir (Tünger 2005).

**Seroloji:** Hasta serumunda spesifik IgM ve Ig G antikorları çeşitli yöntemler ile araştırılabilir. 1/256 ve üzerindeki titreler veya ardışık çalışılan örneklerde dört kat titre artışı tanı için değerlidir. Sağlıklı insanlarda 1/128'e kadar pozitiflik olabilir. Antikorlar genellikle geç oluşur ve hastalık geçirildikten sonra uzun süre yüksek titrelerde devam edebilir (Tünger 2005).

**Nükleik asit çoğaltma yöntemleri:** Solunum sekresyonlarında bakterinin saptanmasında kültüre eşdeğer bir duyarlılığa sahiptir. Kültüre göre en önemli avantajı saatler içerisinde sonuçlanmasıdır. Doğru uygulamalarla moleküler tanı yöntemlerinin kültürden daha duyarlı sonuç vermektedir. Testin duyarlılığının alt solunum yolu örneklerinde %80-90, serumda %30-50 ve idrarda %50-90 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Testin özgüllüğünün ise %90 üzerinde olduğu ileri sürülmektedir (Murdock 2003).

### 2.2.7. *Klebsiella pneumoniae*:

#### **Laboratuvar tanı:**

Klebsiellalar her türlü besiyerlerinde iyi ürerler. İzolasyon besiyerinden hazırlanan saf kültürde bakterinin morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri incelenebilir. Hareketsiz olması, glikoz ve laktozu asit ve gaz oluşturarak fermente etmesi, oksidaz deneyinin negatif olması, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanması, H<sub>2</sub>S oluşturmaması, üreaz oluşturması, lizini dekarboksile edip ornitini etmemesi, jelatini eritmemesi gibi özellikleri ile *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* diğer gram negatif çomaklardan ayrılabilir. *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* birbirinden indol testi ile ayrılabilir (Tünger 2005).

### 2.2.8. *Staphylococcus aureus*:

#### **Laboratuvar tanı:**

**Kültür:** Klinik örnekler koyun kanı eklenmiş zengin besiyerlerine ekilmelidir. Aerobik ve anaerobik koşullarda 24 saat içinde hızla üremektedirler.

**Moleküler tetkikler:** İzolatları alt tür düzeyinde tanımlama ve direnç genlerini göstermede daha hızlı ve duyarlıdır. Klinik örneklerden direk metisilin dirençli *S. aureus* suşlarını saptamada ve bu dirençli suşlardaki dirence yol açan mecA genini saptamak için kullanılabilir (Murray 2009).

## 2.3. Bakteriyel direnç genleri:

### 2.3.1. NDM ve CTX-M geni:

Antibakteriyel direnç, farklı mekanizmalar ile gelişebilir. Bazı mikroorganizmalar bir kaç mekanizmayı barındırarak çok ilaca dirençli olma potansiyeli taşırlar. Beta-laktamaz üretimi ile gelişen direnç, Gram negatif enterik bakterilerde en önemli direnç mekanizmasıdır. *Enterobacteriaceae*'larda yeni beta-laktamazlar olarak adlandırılan plazmid kaynaklı sefamisinazlar, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve karbapenemleri hidrolize eden enzimler (karbapenemazlar) öne çıkmaya başlamıştır. GSBL grup beta-laktamazlar, oksimino sefalosporinlere (sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim ve sefepim) ve monobaktamlara (aztreonam) dirence neden olurken, sefamisinler (sefoksitin, sefotetan) veya karbapenemlerde dirence neden olmazlar. Bu enzimler klasik beta-laktamaz inhibitörleri (sulbaktam, klavulanik asit, tazobaktam) ile inhibe edilir (Taşova 2011). GSBL ilk kez Almanya'da 1983'de tanımlanmıştır. GSBL 1980-1990 yılları arasında *K.pneumoniae*'de baskın iken, 2000'li yıllarda *E.coli*'de de giderek artarak saptanmaya, hatta öne geçmeye başlamıştır. GSBL üreten *Klebsiella* türleri genelde nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilirken, *E.coli* daha sıklıkla toplum kökenli enfeksiyonlarda görülmektedir (Pitout 2010). Önceleri TEM ve SVH enzimleri tüm dünyada yaygın iken, son yıllarda CTX-M enzimleri en yaygın GSBL tipi olmaya başlamıştır (Taşlı 2010). CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) dünyadan yaygın bir şekilde bildirilmekte ve *Enterobacteriaceae*'de plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Bugüne kadar *E.coli*, *K.pneumoniae* ve *Salmonella enterica serovar Typhimurium* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* üyesine ait çeşitli klinik izolatlarda 40 kadar farklı CTX-M enzimi saptanmıştır. CTX-M tipi enzimlerin genel olarak sefotaksime karşı seftazidimden daha büyük hidrolitik aktivite gösterdiği bilinmektedir (Aktaş 2005).

NDM-1, yeni tanımlanan bir karbapenemaz'dır. NDM-1 enzimine sahip bakteriler aynı zamanda GSBL ve karbapenemaz da üretir. Bu bakterilerin sahip olduğu direnç, transfer edilebilen moleküler olarak B sınıfı (Çinko metallo-) beta laktamaz grubuna dâhildir. Bu enzimlerin aktif kısmında çinko iyonları bulunur, serin bulunmaz. İlk kez 2008'de *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatında izole edildi (Yong 2009). Yeni Delhi'de hastanede yatarken İsveç'e transfer edilen bir hastadan izole edilen NDM-1, diğer metallobetalaktamazlar gibi aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidrolize eder. Diğer direnç mekanizmalarının birlikteliği ile NDM-1, çoğu *Enterobacteriaceae*'yi, antibiyotiklerin çoğuna dirençli, sadece kolistin ve

daha az olarak tigesikline duyarlı hale getirir (Yong 2009). Günümüzde çok sayıda mikroorganizmanın bu enzimi taşıdığı yayınlanmıştır. *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *E.coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia* spp, *Proteus* spp. ve *Morganella morgannii* bakterileri örnek verilebilir (Leverstein 2010). Bu direnci taşıyan mikroorganizmalar hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilir ve başlıca üriner sistem enfeksiyonu, sepsis, pulmoner enfeksiyonlar, peritonit, cihazla ilişkili enfeksiyonlar ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmişlerdir (Leverstein 2010).

### **2.3.2.mecA geni:**

*Staphylococcus aureus*'a bağlı gelişen ölümcül enfeksiyonlar, 1941 yılında penisilin G'nin klinik kullanıma girmesinden sonra azalma göstermiştir. Ancak bundan çok kısa bir süre sonra penisiline direnç gösteren *S. aureus*'lar ortaya çıkmış, bunu takip eden 20 yıl içerisinde hastane ve toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i penisiline dirençli hale gelmiştir. Beta-laktamaz enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin klinikte kullanımının başlamasıyla aşılmıştır. Ancak, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde metisilin kullanımının başlamasından sadece iki yıl sonra, 1961 yılında ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatı tanımlanmıştır (Appelbaum 2007). Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında oldukça farklılık göstermektedir (Appelbaum 2007). Stafilokoklarda metisilin direncinden Staphyococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) adı verilen 21-67 kb bir DNA bölgesinde yer alan *mecA* geni sorumludur (Hiramatsu 2002). Bu gen bölgesi bakterinin tüm beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere ve hatta klindamisin, gentamisin ve florokinolon gibi diğer ilaçlara karşı da direnç göstermesini sağlamaktadır (Shorr 2007). Günümüze kadar, sınıf A'dan sınıf E'ye kadar beş farklı *mec* gen kompleksi tanımlanmıştır (Lim 2003). Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zor ve pahalıdır. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında; oksasilin disk difüzyon yöntemi, sefoksitin disk difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, E-test yöntemi kullanılmaktadır.



## 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):

Polimeraz zincir reaksiyonu, nükleik asitlerin in vitro olarak, uygun koşullar altında çoğaltılması esasına dayanan bir test sistemidir. PZR tekniği, tek veya çift sarmallı DNA ya da RNA için kullanılabilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgül, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı olan bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesi esasına dayanır. Bu teknik, hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde taklit edilmesi esasına dayanır. Bir çeşit in vitro klonlamadır. Özellikle kültürü yapılamayan mikroorganizmaların direkt tanısında oldukça başarı sağlamaktadır (Durmaz 2001).

Biyoteknolojide 1990'ların ikinci yarısının sonları ve 2000'lerin başlarındaki büyük gelişmeler, şimdi enfeksiyöz hastalıkların tanısında uygulanan modern tekniklerin gelişmesi ve belirgin ölçüde hassaslaştırılması ile sonuçlanmıştır. Bu teknikler moleküler biyolojinin önemli malzemeleridir ve dünya genelinde hastalıkların tanısının konulması, antimikrobiyal tedavinin yönlendirilmesi ve hastane epidemiyolojisi ve enfeksiyon kontrolü için klinik laboratuvarlarda düzenli olarak kullanılırlar (Pfaller, 2001; Wolk, 2001; Raoult, 2004).

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya imkânsız olan enfeksiyöz ajanların tanımlanmasında halen en değerlisidir ve bu teknikler ile medikal uygulamada sık karşılaşılan patojenlerin hızlı (aynı gün) ve doğru olarak belirlenmesini sağlamıştır (Alvarez-Barrientos, 2000; Houpiqian, 2002; Mezzasoma, 2002; Hazelton, 2003; Cockerill, 2004; Raoult, 2004).

Rutin klinik muayenelerde hastalık ajanlarının izolasyon ve identifikasyonları oldukça zaman almakta ve bazen de herhangi bir etken ayrılamamaktadır. Serolojik testlerde, şüpheli veya negatif sonuçlar verdiği gibi yanlış negatif ve pozitif reaksiyonlar da elde edilebilmektedir. Bunun gibi olgularda PZR büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Amplifikasyondan sonra işaretli problemlerin kullanılması veya elektroforezden sonra oluşan kanıtların boyanarak (ethidium bromidle) görüntülenmesi, tanıyı kolay hale getirmektedir. PZR yöntemi günümüzde; kültürü yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların (*M. lepra*, *M. tuberculosis*, *T. pallidum*, *C. trochomatis*, *M. pneumonia*, *C. Burnettii* vb.) teşhisinde, toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında, antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde (MRSA, VRE vb.), mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında, gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan

mikroorganizmaların tanısında, diğer mikrobiyolojik araştırmalar (moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji, vs.) yaygın olarak kullanılmaktadır (Durmaz 2001). Moleküler yöntemler güvenilir testler olup, duyarlılık ve özgülükleri oldukça yüksektir. Tanı için az miktarda klinik materyal gerektirmeleri ve klinik materyallerde bulunan inhibitör maddelerden etkilenmemeleri nedeniyle izolasyonları, üretilmeleri veya identifikasyonları çok zor olan bakteriyel ve viral ajanların belirlenmesinde büyük yararlar sağlamaktadırlar (Tarhan 2002) .

PZR, istenilen sayıda tekrarlanabilen sıcaklık döngülerinden oluşur. Bir PZR döngüsü her biri farklı sıcaklık derecelerinde gerçekleşen sırasıyla, DNA' nın iki zincirinin birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA ya bağlanması (bağlanma-annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA lar oluşturacak şekilde uzaması (uzama-extension) aşamalarından meydana gelir.

PZR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için reaksiyon karışımında; çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp, ona bağlanacak olan DNA primerleri; primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz; sentezde kullanılacak deoksिनükleotid trifosfatlar; polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar; enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg<sup>++</sup> iyonları gerekir.

Denatürasyon aşamasında, bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrofüj (Ependorf, vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir aletin (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 95°C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nükleik asitin iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlanır. Bu işlem için, materyalin türüne göre değışmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır.

Primerlerin bağlanması aşamasında, ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıyı 50-52°C ye indirerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Üçüncü basamak olan sentez basamağında primerin bağlandığı yerden itibaren 5'-3' yönünde komplementer DNA sentezi başlar. DNA sentezinin başlayabilmesi için sıcaklığın, Taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72°C'ye getirilmesi gerekir. Böylece Taq polimeraz, hedef DNA'ya tutunmuş olan primerin 3' ucundan itibaren zincire yeni nükleotidler ekleyerek komplementer zincir sentezine başlar. Her yeni eklenen nükleotidin 3' hidroksil ucu

açıktadır ve bir sonraki nükleotid bu uca bağlanır. Böylece, PZR'ın 3 aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşamasının 25-30 kez tekrarlanması ile tek bir hedef DNA segmenti, 2<sup>n</sup> formülüne göre yaklaşık 33,6 milyon çoğaltılmış olur. PZR için her türlü kaynaktan temin edilen DNA (veya RNA) kullanılabilir. Kan, serum, vücut sıvıları, dokular, organlar, fikse edilmiş dokular, vs. çok fazla yararlanılan materyaller arasındadır. PZR'nin çok duyarlı olması sayesinde çok az miktarda örnek yeterli olmaktadır (Durmaz 2001).

#### **2.4.1 Multipleks PZR:**

PZR teknolojisinin bir versiyonu olan yöntem, birçok enfeksiyonun tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle; amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma veya aynı bakteri geni üzerindeki farklı hedef bölgeleri için özgül olan primerler kullanılarak, çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir. Bu teknik *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* gibi birçok patojenin tanısında kullanılmıştır (Durmaz 2001).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM:**

Eylül 2011-Nisan 2013 tarihleri arasında akut alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Konya Numune Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerine başvuran, toplum kökenli pnömoni, KOAH alevlenmesi ve bronşiektazi akut alevlenmesi tanısı konulan, ayaktan veya yatırılarak tedavi edilen, 197 hasta çalışmaya alındı.

TKP tanısı için akut başlangıçlı öksürük, yeni veya artmış mukopürülan balgam, 37.8 C üzerinde veya 36. C° altında vücut sıcaklığı, pleurotik göğüs ağrısı, dispne, artmış CRP ve sedimentasyon hızı, periferik kan lökosit değeri 10.000 üzeri veya 4.000 altı olması, yaygın kas ağrısı, infiltrasyon veya konsolidasyon şeklinde radyolojik bulguların olması şartları arandı. Bu kriterlerden en az 3 tanesiyle uygun klinik bulguların varlığı, TKP kabul edildi.

Hastalara KOAH tanıları, GOLD 2011 kriterlerine göre uygun anamnez fizik muayene ve solunum fonksiyon testi ile konuldu. Akut alevlenme tanısında; dispne, balgam miktarı ve balgam pürülansında artış olarak önceden tarif edilmiş olan her 3 kriterin de varlığı arandı.

Bronşiektazi tanıları, uygun anamnez ve fizik muayene bulguları ile yüksek rezolusyonlu toraks tomografisi ile konuldu.

Son 10 gün içinde hastaneye yatış ve antibiyotik kullanma öyküsü, eşlik eden immünsupresyon, solunum yetmezliği, malignansi, konjestif kalp yetersizliği olan hastalar çalışmaya dâhil edilmedi.

Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı. Çalışma 1215180030 nolu projeye Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş ve Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 02.03.2012 tarih ve 2012/33 sayılı kararı ile onay almıştır.

#### **3.1. Kültür:**

ASYE tanısı alan erişkin hastalardan balgam ve BAL, çocuk hastalardan nazofarengeal sürüntü örnekleri alındı. Steril kaba alınan balgam örnekleri, fiberoptik bronkoskopi ile alınan BAL örnekleri ve nazofarengeal sürüntü örnekleri bekletilmeden Gram boyanarak mikroskopik olarak değerlendirildi.

**Balgam numunesi alımı:**

Balgam alınmadan önce hastanın ağız steril su ile çalkalandı ve gargara yapıldı. Balgam alınamayan hastalardan indüklenmiş balgam numunesi toplandı. Bunun için göğüs hastalıkları hekimi gözetiminde hastaya steril, ılık, aerosolize hipertonic tuzlu su (%10 NaCl) inhalasyonu yapıldı. Bu solüsyon hastaya nebulizatör yardımı ile 10 dakika kadar derin ve yavaş solutuldu, sonra derin ve kuvvetli bir öksürük ile balgam alındı ( Pin 1992; Paggiaro PL 2002).

Daha sonra alınan balgamın kalite yönünden incelemesi yapıldı. Belirgin olarak tükürükten ibaret olduğu görülen balgamlar incelemeye alınmazken balgamın pürülan yerinden yapılan Gram boyalı preparatların incelemesinde 100 kez büyütme ile incelenen bir mikroskopik alanda 10'dan fazla epitel hücresi görülen balgamlar incelemeye alınmadı. 25 üzerinde lökosit, 10'un altında epitel görülen balgamlar kaliteli balgam örneği olarak değerlendirildi (Bilgehan 2009).

**Nazofarengal sürüntü numunesi alınışı:**

Nazofarengal sürüntü alınacak çocuk hasta sırtüstü pozisyonda yatırıldı, eküvyonla burundan girilerek nazofarenksin her iki tonsil mediali ve uvula arkası bölgelerinden sürüntü örneği alındı. Bu şekilde alınan örnekler eSwap Liquid Amies (Copan, İtalya) transport besiyeri ile labaratuvarımıza ulaştırıldı.

**BAL numunesi alınışı:**

Göğüs hastalıkları hekimi tarafından Olympos marka steril edilmiş fiberoptik bronkoskop ile, radyolojik olarak enfeksiyon belirtileri olan bronş ağzından steril distile suyun verilerek tekrar steril kaba aspire edilmesi ile BAL örnekleri alındı. BAL sıvısı örneklerinden ilk olarak gram boyama yapıldı. Boyama sonucunda bakteri ve lökosit görülen numuneler çalışmaya alındı (Murray 2009).

**Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması ve içeriği:**

**Koyun kanlı agar:** Hazır ticari olarak satılmakta olan ve 90 mm çapında petri içerisinde, %5 koyun kanı içeren Mueller Hinton agar kullanıldı (Biomerieux, Fransa).

**Eosin Metilen Blue Agar:** Toz halinde ticari olarak satılmakta olan EMB agar, bir balon içerisinde 1 lt distile suya 36 gr eklenip 12 C°de 15 dakika otoklavlanarak hazırlandı. El

yakmayacak sıcaklığa (40-50°C'ye) düştüğünde daha önceden steril etmiş olduğumuz cam petrilere (70-90mm çapında) 0.4mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü ve besiyeri oda ısısında donduktan sonra plakları ters çevirerek buzdolabında +4 °C 'de muhafaza edildi. Oda ısısında bir süre beklettikten sonra ekimler yapıldı.

**Çikolatamsı Agar:** Toz halinde ticari olarak satılmakta olan Gelose Mueller Hinton 2 (MH2-D) agardan (Biomérieux, Fransa) steril bir balon içerisine 1litre suya 38 gram olacak şekilde konuldu ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan çıktıktan sonra besiyerinin sıcaklığı 50-55 °C'ye düştüğünde % 5 oranında insan kanı (tam kan) eklendi. Kanı ekler eklemeyen balonu yavaş hareketlerle alev üzerinde çalkalayarak ısının etkisiyle eritrositlerin parçalanması ve sonuçta besiyerinin renginin kahverengi olmasını sağlandı. Steril cam plaklara besiyerini dökerek besiyerinin donması sağlandı. Daha sonra buzdolabının +4 C° bölümünde muhafaza edildi. Ekim yapılmadan önce oda ısısında bir süre bekletildi ve daha sonra ekimleri yapıldı.

#### **Konvansiyonel yöntemler:**

##### **Katalaz Testi (Gunn ve ark 1987)**

- Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze ile yeterli miktarda alınarak temiz bir lamın üzerine konuldu.
- Üzerine, % 30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı.
- Hidrojen peroksit katılmasından sonra hava kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

**Koagülaz Testi:** Çalışmamızda lamda koagülaz testi yapıldı. Lam üzerine bir damla latex koagülaz (Oxoid) damlatıldı. Üzerine test edilecek bakteri ile süspansiyon yapıldı. İyice karıştırıldıktan sonra aglütinasyon varlığı pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

**Oksidaz deneyi:** Kovak ayırıcı (%1.0 tetramethyl-p phenilenediamine hydrochlorid), steril emici kağıt şerit üzerine damlatıldı. Sonra öze ile incelen koloniden alınıp ıslatılmış kâğıda sürüldü. Oluşan koyu mavi-mor renk, testin pozitif olduğunu gösterdi (Bilgehan 2009).

**Gram boyalı preparat:** Balgamdan boyalı preparat hazırlamak için öze ile irinli kısımlarından alınan balgam temiz bir lamın üzerine bırakıldı. Öze ile dairesel hareketlerle homojen ve ince

bir tabaka halinde yayıldı. Havada kurutulan ve alevde tespit edilen preparat Gram yöntemi ile boyandı (Bilgehan 2009). İmmersiyon yağı damlatılarak incelendi.

Hastalardan alınan balgamın pürülan veya varsa kanlı kısımları, BAL ve nazofarengeal sürüntü örnekleri koyun kanlı agar, EMB agar ve çukulata agar besiyerlerine ekildi. *H.influenzae* için koyun kanlı agara ayrıca ekim yapıldı. Yapılan ekim çizgisine dik olarak ATCC 29213 standart *S. aureus* suşu ekildi. 48 saatlik inkübasyon sonunda satellit (sütanne) fenomeni yönünden değerlendirildi.

Balgamda ve diğer solunum örneklerinde birden çok sayıda bakteri olabildiğinden baskın bakteriyi belirleyebilmek için standart yöntemlerle çaprazlama ekim yapıldı. Önce öze ile plağın bir kenarına birbirine paralel birkaç çizgi çizildi. Bundan sonra öze alevde steril edildi. Daha sonra öze ile ilk çizilen çizgileri, her çizişte bir geniş açı oluşturacak şekilde çaprazlayarak ekim tamamlandı. Plaklar 37 °C'de, %5-10 CO<sub>2</sub>' li ortamda 24-48 saat inkübe edildi. İlk çizgi ekimlerinde bol ve sonraki ekim çizgilerinde gittikçe azalan sayıda bakteri kolonileri arasında baskın koloni araştırıldı. İlk çaprazlama ekim çizgisi bölgesinde 10 ve daha çok, ikinci çaprazlama ekim bölgesinde 5 ve daha çok, üçüncü çaprazlama ekim bölgesinde toplam 5 ten az koloni oluşturan bakteriler ekim egemen bakteriler olarak kabul edildi (Bilgehan 2009).

İnkübasyon sonunda kanlı agar plaklarında küçük, parlak, yeşil hemolizli (alfa hemoliz) koloniler baskın ise *S.pneumoniae* düşünülerek optokin duyarlılığı bakıldı. Bunun için koyun kanlı agara şüpheli koloniden ekim yapılarak içinde 5 µg optokin (ethylhydrocupreine hydrochloride) içeren hazır ticari optokin diski yerleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda optokin diskinin etrafındaki duyarlılık zonu ölçüldü. 16 mm ve daha büyük çapta ise duyarlı kabul edildi (Bilgehan 2009). Aynı koloniden Gram boyama yapılarak gram negatif diplokoklar görüldü. Daha sonra optokin duyarlı olan koloninin Vitek 2 Compact (Biomerieuks, Fransa) tam otomatik tanımlama sistemi kullanılarak identifikasyonu yapıldı.

Kanlı agar besiyerinde 1-2 mm çapında sarı veya beyaz, mat ve beta hemoliz oluşturan koloniler baskın ise *S. aureus* yönünden değerlendirildi. Gram boyama yapıldı. Katalaz ve koagülaz testi yapıldı. Her iki test pozitif olan bakterinin Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) tam otomatik tanımlama sistemi kullanılarak tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık testi yapıldı.

EMB besiyerinde üreyen Gram negatif bakterilerin de benzer şekilde Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) tam otomatik tanımlama sistemi kullanılarak tanımlaması ve antibiyotik duyarlılık testi yapıldı.

Çikolata agara ekim yapıldıktan sonra plağın ortasına, çap boyunca *S. aureus* ATCC 29213 standart suşundan çizgi ekimi yapıldı. 24- 28 saatlik inkübasyon sonunda *S. aureus* hemoliz zonu boyunca üremenin olup olmadığı kontrol edildi ( Bilgehan 2009).

BAL kültürlerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda  $10^5$  ve daha fazla üreyen bakteriler etken kabul edildi (Murray 2009).

### **Bakterilerin Biyokimyasal Özellikleri**

Bakterilerin biyokimyasal özellikleri Vitek 2 (Biomerieux, Fransa) tam otomatik bakteri tanımlama sistemi ile belirlenmiştir. Vitek 2 sistemi bakterilerin ve mayaların tanımlanmasında kullanılan, kolorometrik, bilgisayar destekli bir yöntemdir. Tanımlama liyofilize kartlara, 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonunun dağıtılması, 8-16 saat  $35,5 \pm 1,0$  °C'de cihazın inkübatöründe inkübasyondan sonra kuyucuklardaki biyokimyasal verilerin toplanıp, veri tabanındaki datalarla karşılaştırılmasıyla yapılır. Tanımlama amacıyla, GN (Gram negatif) tanımlama kartı, GP (Gram pozitif) tanımlama kartı kullanılmıştır.

### **3.2. Multipleks PZR:**

Bu çalışmada bakterilerin amplifikasyonu CAP-Bac-PN Mix (Gen ID®; Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) kiti kullanılarak multipleks PZR yöntemi ile çalışıldı. PZR yöntemi için önce DNA izolasyon işlemi yapıldı, daha sonra multipleks PZR basamaklarına geçildi. Çalışmada RDB 2246/ RDB 2246X BAC HOSPİTAL multipleks PZR kiti kullanıldı. Yapılan PZR reaksiyonundan sonra Reverse Hibridization Assay (Ters Hibridizasyon Testi) RDB 2245 kiti (Gen ID®; Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) kullanılarak yapıldı. Tüm işlemler güvenlik kabini bulunan ortamda steril şartlara uyularak yapıldı. Tüm kit malzemeleri 2-4 °C'de saklandı.

Çalışma 3 aşamada gerçekleştirildi:

-Bakteri DNA izolasyonu

-PZR aşaması



-Hibridizasyon aşaması

### **3.2.1. DNA izolasyonu:**

#### **Kit içeriği;**

1. Lysis Buffer 30 ml
2. Binding buffer 40 ml
3. Washing Buffer A 30 ml
4. Washing Buffer B 10 ml
5. Elution Buffer
6. Spin Columns

#### **Protokol:**

1. 1000 ml distile su ile vortekslenerek homojenize edilen balgam örneklerinden 300 µl alınarak 1,5 ml'lik tüp içine aktarıldı.
2. 500 µl buffer VL ( kristalize olmuş ise 37 derecede 15 dakika bekletilerek çözüldü) tüp içersine pipetlendi ve 10 saniye vortekslendi.
3. Oda sıcaklığında (15- 25 °C) 10 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda 700 µl buffer RBI tüp içersine pipetlendi ve 10 saniye vortekslendi.
5. 750 µl lizat spin kolona aktarıldı ve 12.000 rpm de 20 saniye santrifüjlendi.
6. 4. Basamakta elde edilen lizatın kalan kısmı spin kolona aktarıldı ve 12.000 rpm de 30 saniye santrifüjlendi.
7. Kolona 500 µl buffer RBW pipetlendi ve 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi.

8. Kolona 500 µl buffer RBW pipetlendi ve 12.000 rpm' de 30 saniye santrifüjlendi
9. Kolon boş olarak 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüjlendi
10. Kolona 40 µl nükleaz free water pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 12.000 rpm' de 1 dakika santrifüjlendi
11. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı.

### **3.2.2. PZR aşaması:**

#### **RDB2246 amplifikasyon (çoğaltma)**

#### **Kit İçeriği**

1. Primer Nükleoitid karışımı
2. PN-Mix Hosp 1: 300 µl
3. PN-Mix Hosp 2: 300 µl
4. Kontrol DNA

#### **Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller**

1. DNA izolasyon kiti
2. Thermalcycler
3. Termstabil DNA Polimeraz Enzimi ve buffer, MgCl<sub>2</sub>
4. PZR tüpü, filtreli pipet ucu

#### **Testin prensibi:**

Klinik örnekten izole edilen bakteriyal DNA' dan PN-Mix Hospital 1 ve 2 karışımları kullanarak yapılan multiplex PZR ile *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M. catarrhallis*,

*C.pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *E. cloacae*, bakterilerinin tespiti yapıldı.

**Testin duyarlılığı:** Çalışmamızda kullanılan kit  $10^3$  ve üzeri bakteri DNA'sını saptayabilmektedir

Tüm kit içeriği 2- 8 C de saklandı.

95 °C ----- 05: 00 dakika

95 °C ----- 00: 30 saniye

60 °C ----- 02: 00 saniye

95 °C ----- 00: 10 saniye

55 °C ----- 00: 30 saniye

72 °C ----- 00: 30 saniye

72 °C ----- 08: 00 dakika

PZR ürünleri uzun süreli saklamalarda -70 C de, kısa süreli saklamalarda 2-8 C° de saklandı.

### 3.2.3. RDB2245 hibridizasyon aşaması:

#### Kit içeriği:

	<b>RDB2245</b>	<b>RDB2245X</b>
	<b>12 test</b>	<b>60 test</b>
Nitrocellulose strips,(gen probu ile kaplı)	<b>12 strip</b>	<b>60 strip</b>
Denatürasyon reaktifi	<b>0.6 ml</b>	<b>3 ml</b>
Hibridizasyon solusyonu	<b>15 ml</b>	<b>70 ml</b>
Stringent yıkama solusyonu	<b>40 ml</b>	<b>80 ml</b>
Rinse, 5x concentrated	<b>20 ml</b>	<b>80 ml</b>
Konsantre konjüгат solusyonu	<b>0.2 ml</b>	<b>0.75 ml</b>
Konjüгат solusyonu	<b>15 ml</b>	<b>75 ml</b>
Substrat	<b>15 ml</b>	<b>75 ml</b>
İnkübasyon tepsisi	<b>1</b>	<b>5</b>

#### Test prosedürü:

#### Ön hazırlık:

Kit içindeki malzemeler firma önerileri doğrultusunda uygun olarak hazırlandı.

1. Hibridizasyon buffer ve katı yıkama solusyonu 47 °C'ye, diğer tüm solusyonlar oda sıcaklığına getirildi. Çalışılacak örnek sayısına göre inkübasyon tepsileri hazırlandı. Kullanılan kuyucukların kenarları işaretlendi. Daha önce kullanılan kuyucuklar tekrar kullanılmadı.
2. 40 µl denatürasyon solusyonu striplerin yerleştirildiği kuyucuklarının köşelerine eklendi.
3. 20' şer µl PZR ile çoğaltılmış üründen (toplamda 40µl ürün) denatürasyon solüsyonuna pipetlenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

Bu sırada pens ile her bir örnek için bir strip alındı ve bu strip'in işaretli ucu kurşun kalem ile numaralandırıldı.

4. Tray'in örneklerin konulduğu kuyucuklarına dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml hibridizasyon tamponu koyuldu ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı.

5. Forseps ile stripler tüpten çıkarıldı ve inkübasyon tepsisine koyuldu.

6. İnkübasyon tepsi 47 °C'de 30 dakika çalkalanarak su banyosu içinde inkübe edildi.

7. Hibridizasyon tamponu tamamen atıldı ve stripler 1 ml önceden ısıtılmış karışık katı yıkama solüsyonu ile yatay bir çalkalayıcı üzerinde hafif hareketlerle oda sıcaklığında 2 kez birer dakika yıkandı.

8. Her stripe önceden ısıtılmış 1 ml katı yıkama solüsyonu 2 defa eklendi ve 47 °C su banyosunda 15 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.

9. Bundan sonraki işlemlere oda sıcaklığında devam edildi. Solüsyon döküldü ve 1 ml dilüe durulama solüsyonu ile 1 dakika boyunca şeritler 2 kez yıkandı.

10. Striplerin her birine 1 ml hazırlanmış konjugat (konsantre konjugat 1/100 konjugat solüsyonu ile dilüe edildi) eklendi ve oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.



















11. İnkübasyon döneminden sonra konjugat çıkarıldı ve striplerin her biri 3 kez 1 ml dilüe durulama suyu ile yatay çalkalayıcıda yıkandı.

12. Her bir strip üzerine oda sıcaklığına getirilen 1 ml substrat eklendi ve iyice pipetlendikten sonra karanlıkta bantların oluşmasına göre 5-7 dakika inkübe edildi. Çok uzun süreli inkübasyonlar strinin kararmasına sebep olabileceği ve de yanlış değerlendirmelere yol açabileceği için bu basamak, inkübasyon süresi kontrollü bir şekilde takip edilerek sonlandırıldı.

13. 1 ml distile su ile 2 kez yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı.

14. Son olarak, stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kâğıdının arasına konularak kurutuldu ve değerlendirme aşamasına geçildi.

## Sonuçların yorumlanması:

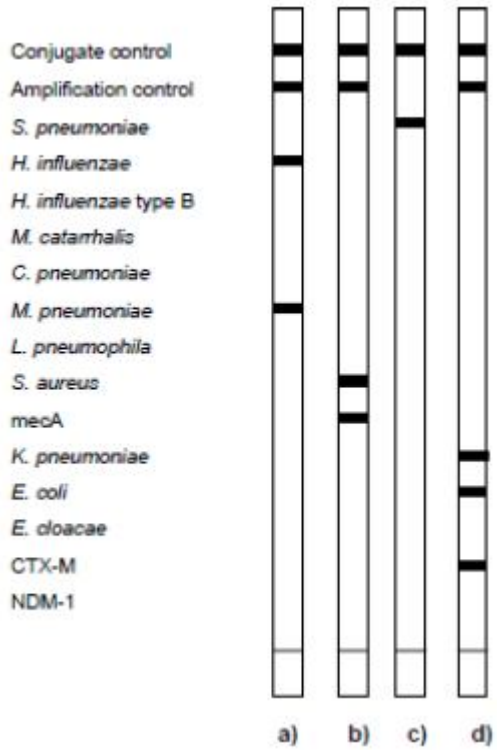
Conjugate control	
Amplification control	
<i>S. pneumoniae</i>	
<i>H. influenzae</i>	
<i>H. influenzae type b</i>	
<i>M. catarrhalis</i>	
<i>C. pneumoniae</i>	
<i>M. pneumoniae</i>	
<i>L. pneumophila</i>	
<i>S. aureus</i>	
mecA	
<i>K. pneumoniae</i>	
<i>E. coli</i>	
<i>E. cloacae</i>	
CTX-M	
NDM-1	
	
	

### Konjugat Kontrol

Her zaman görülmelidir. Hibridizasyon aşamasının başarılı olduğunu gösterir

### Amplifikasyon Kontrol

İnsan genomik DNA'sında bulunan Housekeeping gene GAP-DH içerir. İzolasyon ve amplifikasyon aşamasının kontrolünü sağlar. Bakteri için bant oluşumunun görülmesi o bakteri DNA'sının veya o bakteriye ait direnç geninin varlığını göstermektedir.



Şekil 3.1: Striplerin değerlendirilmesi

a) *H.influenzae* ve *M.pneumoniae* saptanmış

b) *S. aureus* ve *mecA* geni saptanmış

c) *S.pneumoniae* saptanmış

d) *K. pneumoniae*, *E.coli* ve CTX-M geni saptanmış

### 3.3 İstatistiksel analiz:

İstatistiksel analiz için SPSS 21 programı kullanıldı. Parametrik verilere sahip grupların karşılaştırılmasında Independent-Samples T test, çoklu nonparametrik grup karşılaştırmalarda  $\chi^2$  testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.05$  sınırı kabul edildi.

## 4. BULGULAR:

### 4.1. Genel özellikler:

Çalışmaya yaşları 4 ile 88 arasında değişen, 117 erkek, 80 kadın olmak üzere 197 hasta dâhil edildi. 147 TKP, 42 KOAH akut alevlenmesi, 8 bronşiektazi tanısı alan hastalardan, 141 balgam, 45 NFS ve 11 BAL örneği çalışıldı. Hastaların genel özellikleri tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan örneklerin genel özellikleri

	n (%)	Ortalama
Hasta	197	
Erkek	117(59,4)	
Kadın	80(40,6)	
Tanı		
TKP	147(74,6)	
KOAHAA	42(21,3)	
Bronşiektazi	8(4,1)	
Örnek		
NFS	45(22,8)	
Balgam	141(71,6)	
BAL	11(5,6)	
Yaş		40 (±23)
CRP		45,4 (±58)
Lökosit		11,0 (±4,5)
Sedim		37 (±25)

### 2. Kültür sonuçları:

Tüm olguların 62'sinde (% 31,5) kültürde en az bir bakteri üremesi saptandı. Kültür çalışması sonucunda en fazla üreyen bakteriler sırasıyla, *S.pneumoniae* (%16,9), *M.catarhallis* (% 6,1), *S. aureus* (%3,0) oldu. Kültür sonuçları tablo 4.2'de verilmiştir

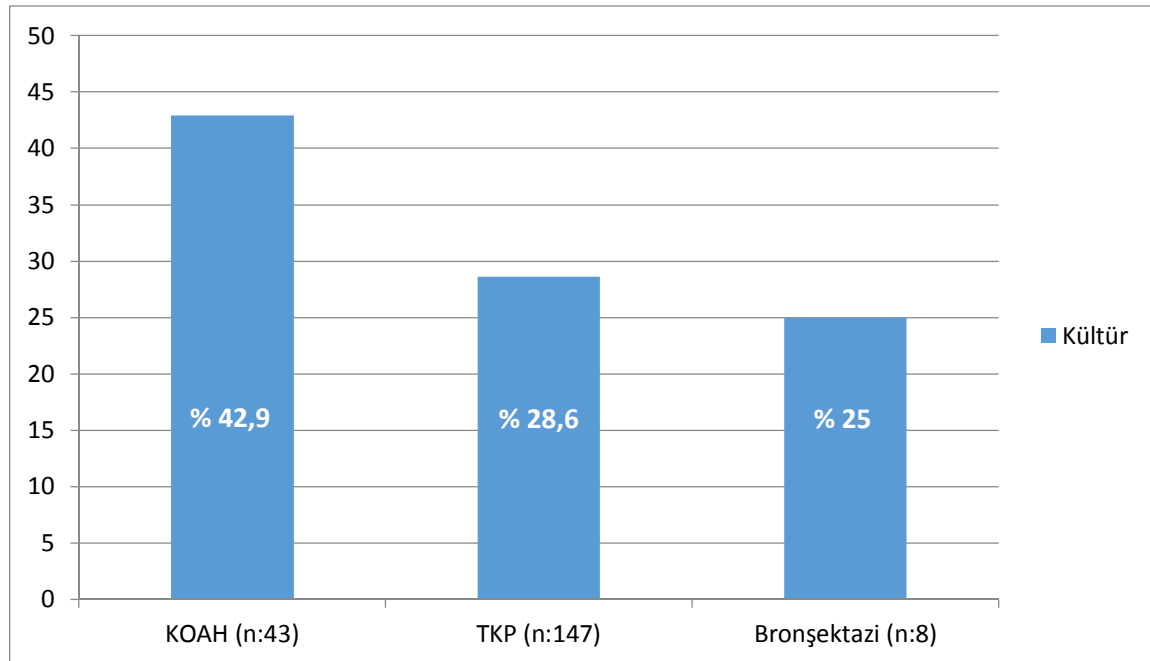


Tablo 4.2. Kültür ile saptanan mikroorganizmaların dağılımı

	n (%)
Üreme yok	65 (33,0)
Normal flora	70 (35,5)
<i>S.pneumoniae</i>	32 (16,2)
<i>M.catarhallis</i>	12 (6,1)
<i>S. aureus</i>	6 (3,0)
<i>K. pneumoniae</i>	5 (2,5)
<i>E.coli</i>	5 (2,5)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarhallis</i>	1 (0,5)
<i>S. aureus</i> + <i>P.aureginosae</i>	1 (0,5)

Kültür sonuçlarına göre en fazla üreme %42,9 ile KOAHAA grubunda oldu. Bunu %28,6 ile TKP ve %25,0 ile bronşiektazi grubu izledi (Şekil 4.1).

Şekil 4.1. Klinik tanıya göre kültürde bakteri üreme oranları



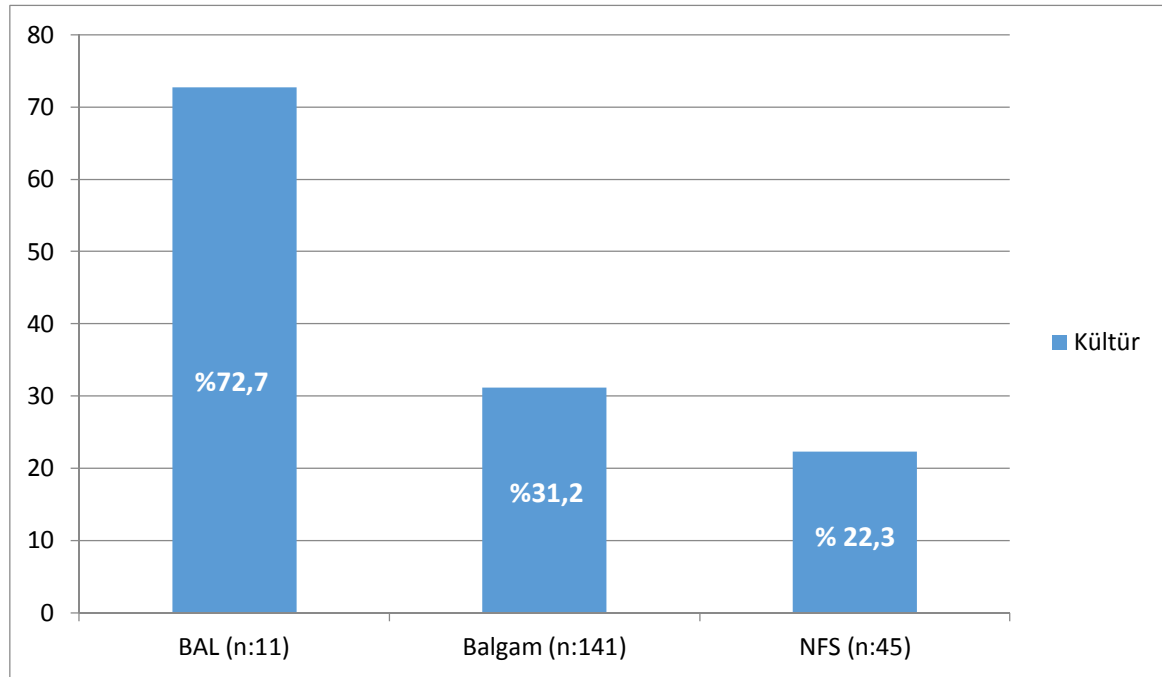
Tanılara göre kültürde üreyen bakteriler ve oranları tabloda verilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Klinik tanıya göre kültürde saptanan mikroorganizmaların dağılımı

n (%)	TKP	KOAHAA	BRONŞİEKTAZİ
Üreme yok	57(38,8)	6(14,3)	2(25,0)
Normal flora	48(32,7)	18(42,9)	4(50,0)
<i>S.pneumoniae</i>	23(15,6)	8(19,0)	1(12,5)
<i>M.catarhallis</i>	8(5,4)	4(9,5)	-
<i>S. aureus</i>	5(3,4)	1(2,4)	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	4(9,5)	1(12,5)
<i>E. coli</i>	4(2,7)	1(2,4)	-
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarhallis</i>	1(0,7)	-	-
<i>S. aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1(0,7)	-	-

Olguların örnek türüne göre üreme oranları karşılaştırıldığında en fazla %72,7 ile BAL örneklerinde üreme oldu. Bunu %31,2 ile balgam ve %22,2 ile NFS örnekleri izledi (Şekil 4.2).

Şekil 4.2. Örnek çeşidine göre kültürde bakteri saptanma oranları



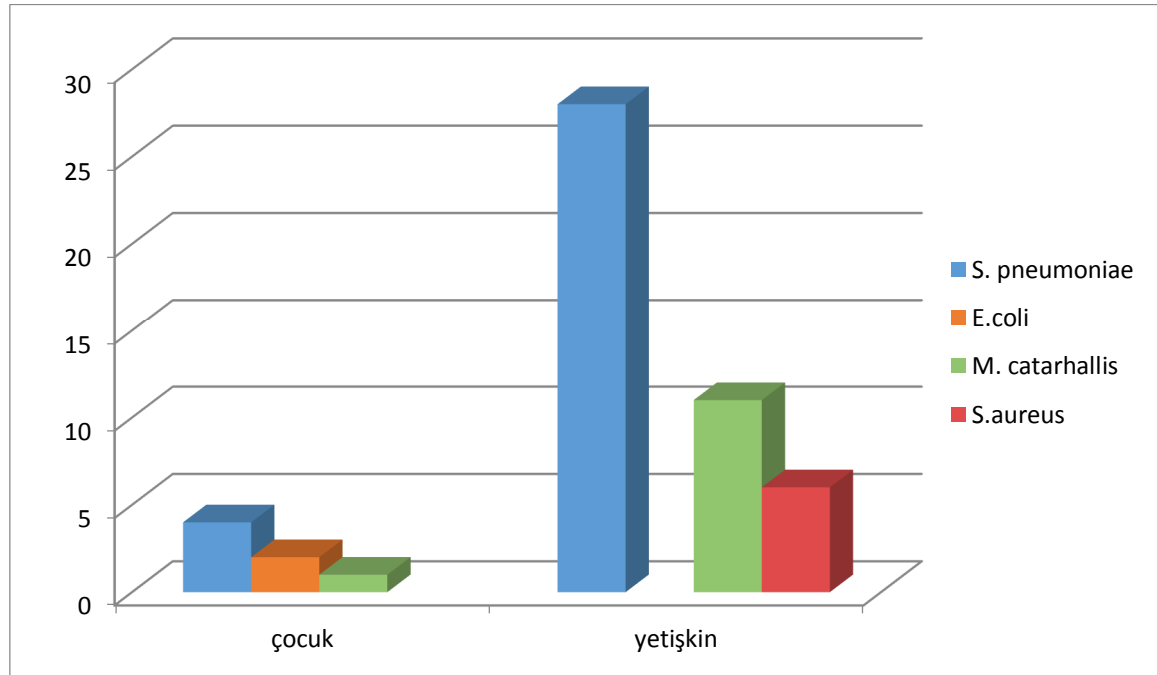
Kültürde üreme ile olguların, cinsiyet, lökosit, CRP ve sedim değerleri açısından anlamlı farklılık bulunamadı. Yaş ile kültürde üreme açısından anlamlı fark vardı. (Tablo 4.4.)

Tablo 4.4. Kültürde üreme ile çeşitli parametrelerin ilişkisi

	Üreme olan	Üreme olmayan	p değeri
Yaş (yıl)	44,8	37,2	0,033
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	35/27	82/53	0,570
Lökosit ( /mm <sup>3</sup> )	11,9	10,5	0,145
CRP (mg/lt)	34,9	50,9	0,195
Sedim (mm/saat)	35,7	37,1	0,803

Kültürde üreme oranları açısından çocuk ve yetişkin hastalar arasında anlamlı farklılık vardı (p=0.026). 41 çocuk hastanın 7'sinde, 156 yetişkin hastanın 55'inde bakteri üremesi saptandı. Çocuklarda en fazla saptanan üç bakteri sırasıyla *S.pneumoniae* (4), *E.coli* (2), *M.catarhallis* (1) oldu. Yetişkin hastalarda ise en sık üç bakteri *S.pneumoniae* (28), *M.catarhallis* (11), *S.aureus* (6) oldu (Şekil 4.3).

Şekil 4.3. Çocuk ve yetişkin hastalarda kültürde üreyen bakterilerin dağılımı



### 4.3. PZR sonuçları

PZR çalışmasında etken saptanma oranları kültüre göre anlamlı ölçüde yüksekti. ( $p<0.005$ ) Tüm olguların 125'inde (%63,5) en az bir etken saptandı.

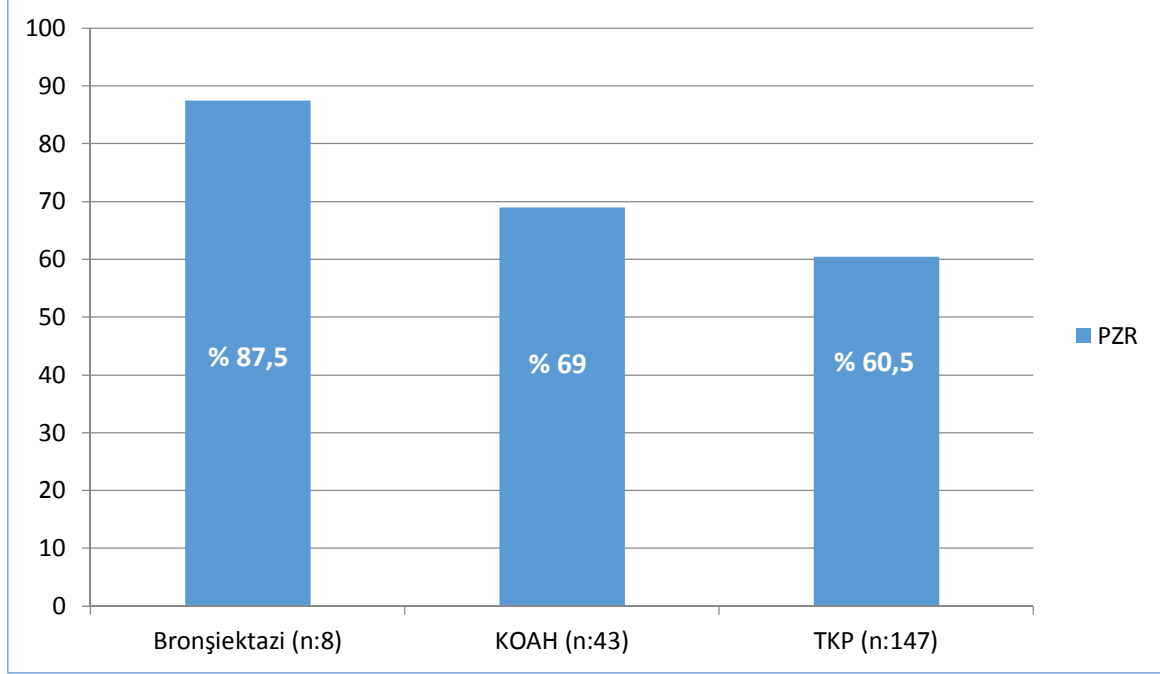
PZR de en çok saptanan bakteriler sırasıyla; *S.pneumoniae* (%32), *H.influenzae* (% 31) oldu. PZR sonuçları tablo 4.5' de verilmiştir.

Tablo 4.5. PZR analizi ile tespit edilen patojenlerin dağılımı

PZR sonucu	n	(%)
Negatif	72	36,5
<i>S.pneumoniae</i>	30	15,2
<i>S.pneumoniae</i> + <i>H.influenzae</i>	29	14,7
<i>H.influenzae</i>	25	12,7
<i>M.pneumoniae</i>	5	2,5
<i>M.catarhallis</i>	5	2,5
<i>E.coli</i>	4	2,0
<i>H.influenzae tip b</i> + <i>M.catarhallis</i>	4	2,0
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarhallis</i>	4	2,0
<i>S.aureus</i>	4	2,0
<i>H.influenzae tip b</i>	3	1,5
<i>H.influenzae</i> + <i>M.catarhallis</i>	3	1,5
<i>H.influenzae</i> + <i>K.pneumoniae</i>	2	1,0
<i>K.pneumoniae</i>	2	1,0
<i>H.influenzae tip b</i> + <i>C.pneumoniae</i>	1	,5
<i>H.influenzae tip b</i> + <i>S.aureus</i>	1	,5
<i>H.influenzae</i> + <i>E.coli</i>	1	,5
<i>H.influenzae</i> + <i>S.aureus</i>	1	,5
<i>M.catarhallis</i> + <i>S.aureus</i>	1	,5
Toplam	197	100,0

PZR'da bakteri saptanma oranı en yüksek %87,5 ile bronşiektazi hastalarında, %69 ile KOAHAA hastalarında, %60,5 ile TKP hastalarında bulundu (Şekil 4.4).

Şekil 4.4. Klinik tanıya göre PZR'de bakteri saptama oranları



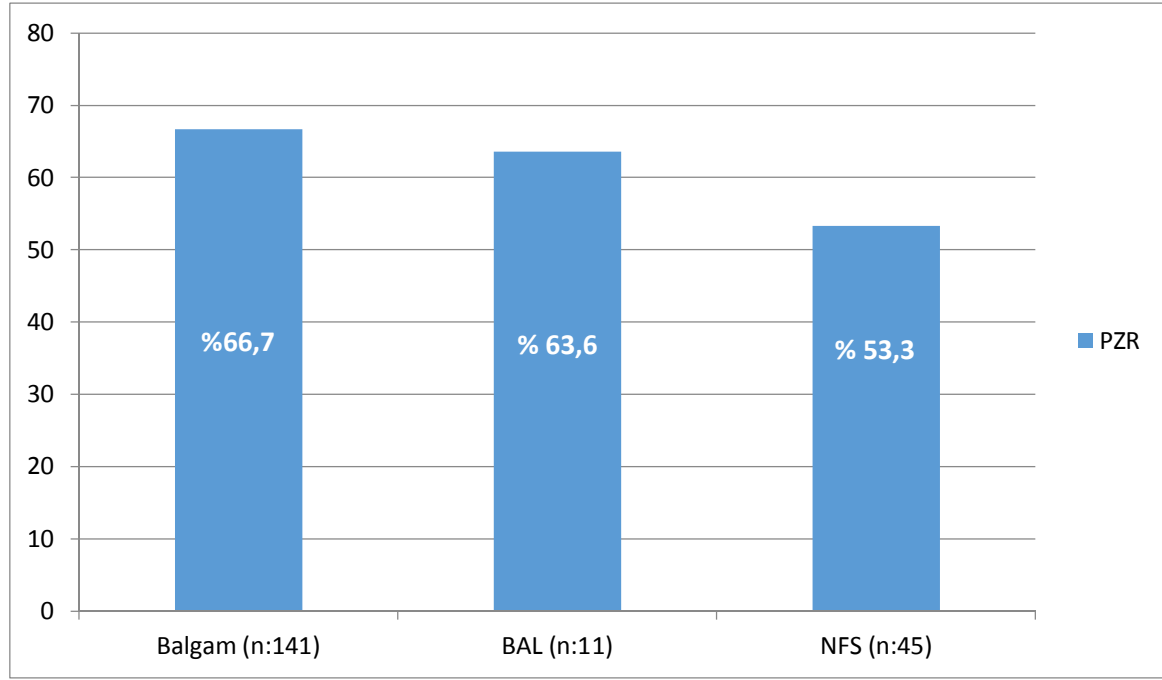
Tanımlara göre PZR'da saptanan bakteriler ve oranları tabloda verilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6.Klinik tanıya göre PZR ile saptanan mikroorganizmaların dağılımı

PZR sonucu	TKP	KOAH	Bronşiektazi
Negatif	58(39,5)	13(31)	1(12,5)
<i>S.pneumoniae</i>	23(15,6)	6(14,3)	1(12,5)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>H.influenzae</i>	23(15,6)	6(14,3)	-
<i>H.influenzae</i>	15(10,2)	7(16,7)	3(37,5)
<i>M.pneumoniae</i>	5(3,4)	-	-
<i>M.catarhallis</i>	2(1,4)	3(7,1)	-
<i>E.coli</i>	3(2,0)	1(2,4)	-
<i>H.influenzae tipb</i> + <i>M.catarhallis</i>	3(2,0)	1(2,4)	-
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarhallis</i>	3(2,0)	-	1(12,5)
<i>S.aureus</i>	4(2,7)	-	-
<i>H.influenzae tip b</i>	1(0,7)	1(2,4)	1(12,5)
<i>H.influenzae</i> + <i>M.catarhallis</i>	3(2,0)	-	-
<i>H.influenzae</i> + <i>K.pneumoniae</i>	-	1(2,4)	1(12,5)
<i>K.pneumoniae</i>	-	1(4,8)	1
<i>H.influenzae tipb</i> + <i>C.pneumoniae</i>	1(0,7)	-	-
<i>H.influenzae tip b</i> + <i>S.aureus</i>	-	1(2,4)	-
<i>H.influenzae</i> + <i>E.coli</i>	1(0,7)	-	-
<i>H.influenzae</i> + <i>S.aureus</i>	1(0,7)	-	-
<i>M.catarhallis</i> + <i>S.aureus</i>	1	-	-
Toplam	147	42	8

Örnek türüne göre PZR'da bakteri saptanma oranları karşılaştırıldığında, %66,7 ile en fazla balgamda etken saptanırken, bunu %63,6 ile BAL örnekleri ve %53,7 ile NFS örnekleri izledi (Şekil 4.5).

Şekil 4.5. Örnek türüne göre PZR'da bakteri saptanma oranları



PZR'da bakteri saptanması ile olguların, yaş, cinsiyet, lökosit, CRP ve sedimentasyon değerleri açısından anlamlı farklılık bulunamadı (Tablo 4.7).

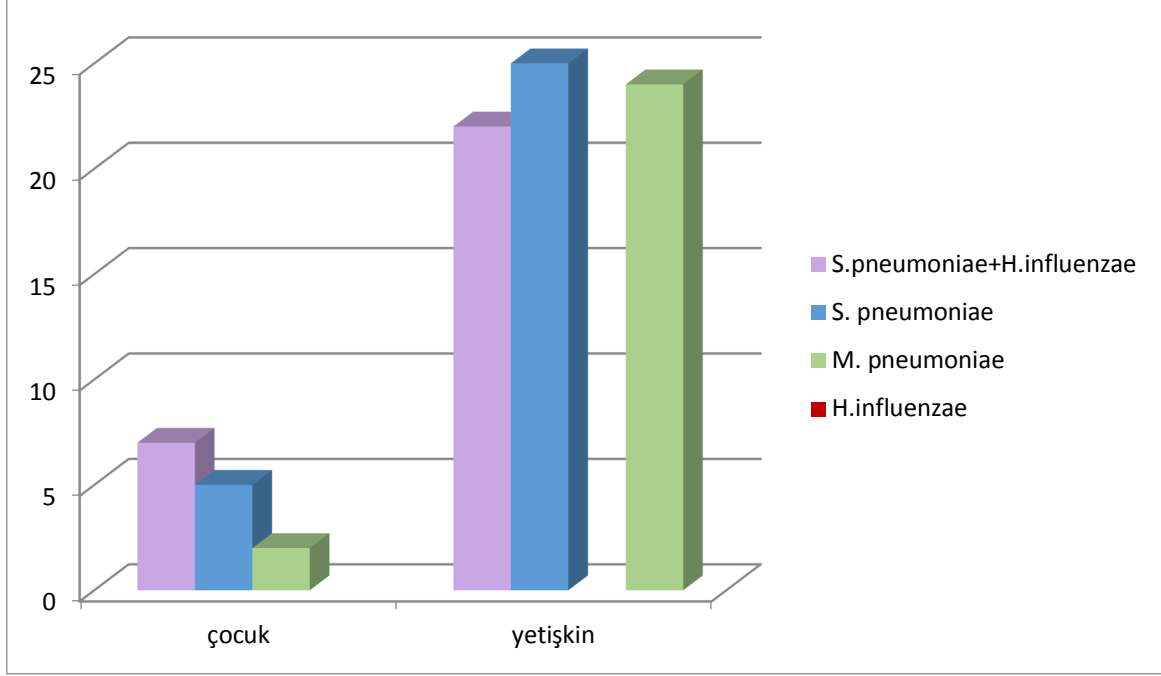
Tablo 4.7. PZR'da bakteri saptanması ile çeşitli parametrelerin ilişkisi

	Üreme olan	Üreme olmayan	p değeri
Yaş (yıl)	41,3	36,7	0,179
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	72/53	45/27	0,548
Lökosit( /mm <sup>3</sup> )	11,5	9,9	0,105
CRP (mg/lt)	43	50	0,606
Sedim(mm/saat)	36,7	36,3	0,948

PZR'da bakteri saptama oranları açısından çocuk ve yetişkin hastalar arasında anlamlı farklılık vardı (p=0.011). 41 çocuk hastanın 19'unda, 156 yetişkin hastanın 106'sında bir veya birden çok etken saptandı. Çocuklarda en fazla saptanan bakteriler sırasıyla *S.pneumoniae*+*H.influenzae* (7), *S.pneumoniae* (5), *M.pneumoniae* (2) ve *E. coli* (2) oldu.

Yetişkin hastalarda ise en sık üç bakteri *S.pneumoniae* (25), *H.influenzae* (24), *S.pneumoniae*+ *H.influenzae* (22) oldu (Şekil 4.6).

Şekil 4.6. Çocuk ve yetişkin hastalar arasında PZR'da saptanan bakterilerin dağılımı



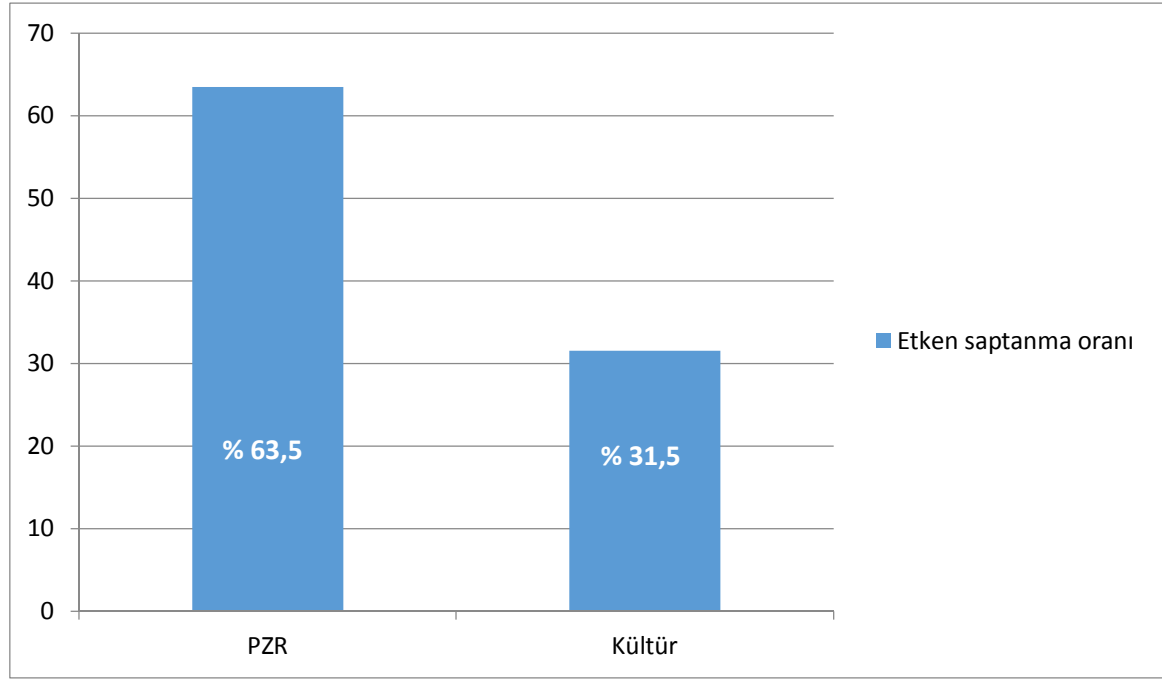
PZR ile CTX-M, NDM VE Mec A genlerine rastlanmadı.

#### 4.3. PZR ve kültür karşılaştırma sonuçları:

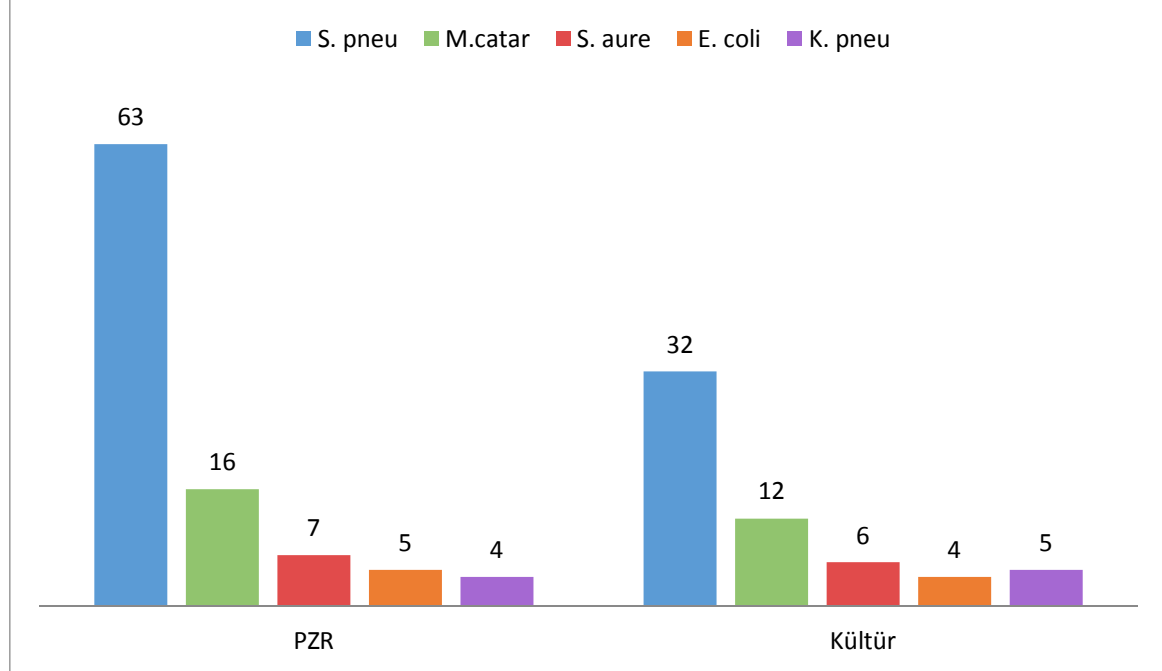
Bakteri saptanma oranları açısından PZR yöntemi ile kültür karşılaştırıldığında PZR yöntemi anlamlı ölçüde yüksekti ( $p < 0.005$ ) (Şekil 4.7). Kültürde 62 hastada üreme olurken PZR çalışması ile 125 hastada bakteri saptandı. Kültürde üreme olan 62 hastanın 60'ında PZR'da da bakteri saptandı. Kültürde üreme olup da PZR'da etken saptanmayan yalnızca 2 hasta oldu. Sonuçlar şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Etken saptanma oranları açısından PZR ve kültürün karşılaştırılması



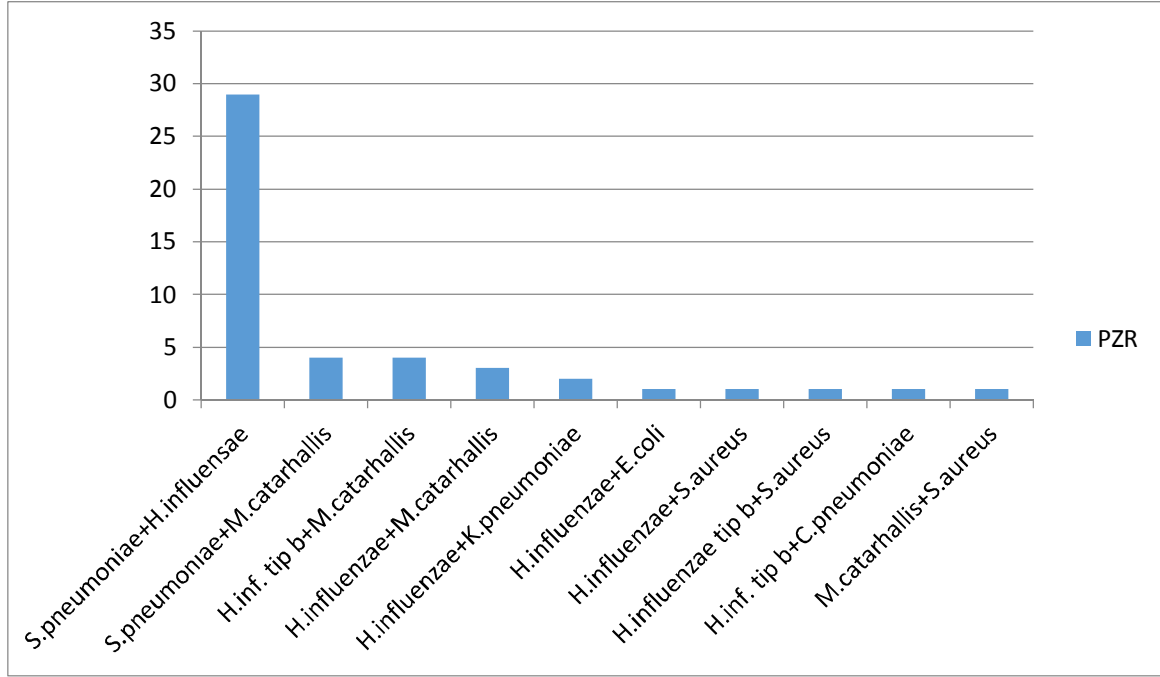
Şekil 4.8. Saptanan etkenler açısından PZR ve kültürün karşılaştırılması



Kültürde *S. aureus* ve *E. coli* üreyen olguların tamamında, PZR'de de aynı bakteriler saptandı. Kültürde üreyen *S.pneumoniae*, *K. pneumoniae* ve *M.catarhallis* olgularının sadece birer tanesinde PZR de bu bakteriler saptanamadı. Kültürde ve PZR'da farklı saptanan sadece bir olgu vardı ve kültürde *S.pneumoniae*, PZR'da *H.influenzae* tip b olarak saptandı.

Çoklu etken saptama oranları açısından PZR ile kültür arasında anlamlı farklılık vardı.( $p<0.001$ ) Kültürde sadece 2 olguda çoklu bakteri saptanırken, PZR'de 47 olguda çoklu etken saptandı. Çoklu saptanan bakteriler şekil 4.9'da verilmiştir.

Şekil 4.9. PZR de çoklu saptanan bakterilerin dağılımı



Kültür altın standart olarak kabul edildiğinde, PZR yönteminin sensitivitesi 0.96, spesifitesi 0.48, pozitif prediktif değeri 0.95, negatif prediktif değeri 0.52 olarak bulundu.

## 5. TARTIŞMA:

Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE), tüm dünyada her yaş grubunda en sık görülen enfeksiyonlardandır. Morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerindendir, hastaların %30'u hastaneye yatış gerektirir (Aydoğdu 2010). Amerika Birleşik Devletlerinde pnömoni tanısıyla hastaneye yatırılan hastalarda mortalite oranı % 8-14, Asya ülkelerinde % 7,3 olarak bildirilmiştir (Song 2008). Pnömonili hastalarda uygun olmayan tedavi hem mortaliteyi hem de komplikasyonları artırmaktadır. Bu nedenle etyolojik tanı, prognoz ve tedavi yaklaşımı açısından önemlidir (Torres 1991). Genel klinik uygulamada pnömoni tedavisi, klinik semptomlara, radyolojik bulgulara ve laboratuvar sonuçlarına göre ampirik olarak başlanır.

KOAH, tüm dünyada oldukça yaygın görülür, BOLD çalışmasında 40 yaş üstü prevalansı %20 bulunmuştur. KOAH akut atakları önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Ayrıca akut ataklar hastalığın prognozunu olumsuz etkiler ve ağır solunum yetmezliğine gidiş sürecini hızlandırır. Hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Bu nedenlerle KOAH akut ataklarının önlenmesi ve tedavisi çok önemlidir. Hastaneye yatırılan ağır alevlenmelerde mortalite % 10'a, mekanik ventilasyon gerektiren alevlenmelerde 1 yıllık takipte mortalite % 40'a kadar çıkmaktadır (GOLD 2007).

ASYE'da erken tanı ve hızlı antibiyoterapi başlanmasının mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Tedavi maliyetlerini azaltmak ve tedavinin etkinliğini artırmak için etken mikroorganizmanın tespit edilmesi gerekir. Ancak ASYE'da etken mikroorganizmayı saptamak oldukça güçtür. Bunun için en sık kullanılan yöntemler balgam gibi solunum yolu sekresyonlarının kültürü ve serolojik yöntemlerdir.

Ancak serolojik yöntemler ile etkenin tesbiti için uzunca bir süreye ihtiyaç vardır ve TKP'li hastaların tümünde antikor gelişmez, bu yüzden duyarlılık ve özgüllüğü sınırlıdır. Akut ve konvelesan dönemde iki kez serum örneği çalışılmasını gerektirir, bu nedenlerle başlangıç tedavisini yönlendirmek için uygun değildir ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Özlu 2007).

Kültür yönteminin dezavantajları ise; ASYE olan hastaların hepsi balgam çıkaramaz, özellikle yaşlı ve çocuk hastalarda balgam elde etmek zordur. Balgam çıkaranların da ancak bir bölümünde kaliteli balgam saptanabilir. Üst solunum yolu, ağız ve boğaz florası ile karışabilir. Hastaların en az %25'i incelemeyen önce antibiyotik kullanmıştır ve bu durum kültürde yanlış

negatifliklere yol açmaktadır. Farklı etken organizmalar için farklı besiyerleri gerekir. Kültür ortamının seçiciliği nedeniyle birden fazla mikroorganizmanın çoğalması engellenir. Sensitivite ve spesifitesi düşüktür. Sonuçların elde edilebilmesi için en az iki güne ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, yapılan çeşitli çalışmalarda bu yöntemlerle vakaların yaklaşık yarısında etyolojik ajan tanımlanabilmiştir (Morozumi 2006). Bu durum tedavide gecikmeye yol açar. Bu yüzden konvansiyonel tanı metotlarının yararı sınırlıdır (Murdoch 2004; Jokinen 1993).

Bu nedenlerden dolayı klinisyenler ampirik olarak antibiyotik tedavi başlamaktadırlar. Ampirik antibiyotik başlanmasında, o toplumda, alevlenmelerdeki etken mikroorganizmaların sıklığını ve direnç özelliklerini bilmek, akılcı antibiyotik seçimi ve tedavi başarısı için gereklidir. Ampirik tedaviyi planlamada ise etyolojik ajanın doğru tahmini önem kazanmaktadır. Bunun için yerel etyolojik verilerin bilinmesine ihtiyaç vardır. Bu yüzden ülkesel ve bölgesel olarak, çok sayıda kültür ve serolojik yöntemlerle etkene yönelik çalışmalar yapılmış ve bunlar ampirik tedavinin temelini oluşturmuştur (Özlu 2007).

Ülkemizde gerçekleştirilen ve toplumda gelişen pnömoni olgularını kapsayan çalışmalara genel olarak bakıldığında, etyolojik ajan saptama oranlarının % 21- 63 arasında değiştiği görülmektedir (Özlu 2007, Köksal 2010). Tipik ve atipik etkenlerin dâhil olduğu bakteriyel etkenlerin kültür ve serolojik yöntemlerle araştırıldığı çalışmalarda pnömonili olguların % 21-45'inde etken tespit edilebilmiştir (Özlu 2007). Ülkemizden bildirilen en yüksek oran, Köksal ve arkadaşlarının yaptıkları sekiz üniversite hastanesinin katıldığı çok merkezli bir çalışmada elde edilmiş ve viral etkenlerinde araştırıldığı bu çalışmada olguların % 63'ünde etyolojik tanıya ulaşılabilmıştır (Köksal 2010).

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan prospektif bir çalışmada hospitalizasyon gerektiren 68 TKP olgusunun 31 (% 45,5)'inde etyolojik ajan saptanmıştır (Günlügür 2001). Bu çalışmada atipik mikroorganizmalara yönelik serolojik inceleme yanında, balgam, bronş aspirasyonu gibi solunum yolu örneklerinin kültür incelemeleri de analiz edilmiştir ve hastalık etkeni ajanların dağılımını; *S.pneumoniae* % 44,2; aerobik gram-negatif basiller % 23,3; *M. pneumoniae* % 16,3; *C.pneumoniae* % 9,3 ve *L. pneumophila* % 7 olarak bildirmişlerdir (Kolsuz 2001). Çalışmacılar, en önemli bulgu olarak kesin tanı konulan olguların 11 (%35,5)'inde birden fazla patojenin saptanmasını bildirmişlerdir. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde TKP olgularını kapsayan bir diğer prospektif çalışmada, benzer şekilde balgam, kan kültürleri ve serolojik değerlendirme yapılmış, dâhil edilen 130 olgunun 57 (% 44)'sinde etken mikroorganizma belirlenmiştir (Saltoğlu 1999). Bu

olguların % 40 kadarının hastaneye yatırılarak tedavi edildiğinin belirtildiği çalışmada, en sık izole edilen patojen *S.pneumoniae* (% 17) iken, diğerleri; % 8 gram-negatif basiller, % 7 *M. pneumoniae*, % 5 *C.pneumoniae*, % 4 *S.aureus* ve % 3 *L.pneumophila* olmuştur (Saltoğlu 1999).

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan retrospektif bir analizde, Göğüs Hastalıkları Kliniği'nde yatırılarak tedavi edilen 68 TKP olgusunun balgamında % 32,4 olguda etyolojik ajan saptanabilmiş ve en fazla izole edilen etken mikroorganizma *S. pneumoniae* (%16,2) olmuştur. Bunu takiben Gram-negatif bakteriler %11,8, diğer streptokoklar % 10,3, *S. aureus* % 7,4, *H.influenzae* % 2,9 ve *P.aeruginosa* % 2,9 oranında saptanmıştır (Uzaslan 2000).

Literatürlerde bildirilen bu oranlardaki farklılıklar, çalışmalara alınan hasta gruplarının ampirik antibiyotik alımı, kullanılan laboratuvar metotlarının farklılığı ve metod sayısına bağlı olabilir (Köksal 2010). Örneğin atipik bakterileri saptamak için sadece serolojik yöntemler kullanıldığında % 10 oranında etken saptanırken buna farklı yöntemlerin eklenmesi ile bu oran % 40'lara yükselmiştir (Creer 2006). Yapılan çalışmalarda pnömoniler dâhil alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık saptanan ajanlar, solunum bakterileri olarak da adlandırılan *S.pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M.catarrhalis* olarak bildirilmiştir (Bakır 2003, File 2003). Çalışmamızda da önceki çalışmalarla uyumlu olarak kültür yöntemiyle en sık *S.pneumoniae*, ardından *M.catarrhalis* ve *S. aureus* izole edilmiştir.

Pnömoni tanısı alan hastalarda tanı sonrası 4-8 saat içinde doğru tedaviye başlanması mortaliteyi azalttığından hızlı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur (Özlu 2007). Moleküler tanı tetkikleri ASYİ' larının hızlı etyolojik tanısına imkân sağlamıştır. Multipleks PZR kullanılarak aynı örnekte, aynı zamanda birden çok etyolojik ajan tanımlanabilmektedir (Templeton 2005). Moleküler tanı yöntemlerinin hızlı ve aynı anda birden çok patojeni saptayabilmesi yanında en önemli avantajlarından birisi de antibiyotik tedavisi alanlarda da etken patojeni saptayabilmesidir (Kais 2006). Antibiyotik alımı sonrası hasarlanan bakteri ve ölü bakteriden kalan DNA'nın saptanmasında moleküler tetkiklerin sensitivite ve spesifitesi yüksektir (Morozumi 2006).

Mustafa ve arkadaşları konvansiyonel tanı metotları ile pnömoni tanısı alan hastaların %39,1'inde mikrobiyal ajan tanımlanabilmiştir. PZR kullanımı ile bu oranın %65,2' ye çıktığını gözlemlemişlerdir (Mustafa 2011). Templeton, konvansiyonel metotlara PZR eklendiğinde mikrobiyal tanımlama oranı % 43'ten % 89'a çıktığını bildirmişlerdir (Templeton 2005).

Ülkemizde moleküler yöntemlerle yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan bir çalışmada, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAHA) alevlenmesi nedeniyle hastaneye başvuran hastalardan alınan indüklenmiş balgam örneklerinde, PZR ve kültür yöntemi ile bakteriyel etkenleri araştırmışlar ve kültür ile %17,7 oranında etken saptayabilirken PZR ile bu oranı % 75,8 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada kültür ile *H.influenzae* hiç saptanamazken PZR %17,7 oranında saptanmıştır (Akın 2011). Çalışmamıza alınan 42 KOAHAA olan hastaların % 42,9'unda kültür ile etken saptanırken PZR ile bu oran % 69 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalarda olduğu gibi her iki yöntemle de en fazla saptanan bakteri *S.pneumoniae* olmuştur.

Celal Bayar üniversitesinde 2012 yılında yapılan çok merkezli çalışmada, TKP tanısı alan hastalardan alınan balgam, BAL örneklerinde etken mikroorganizma aradıkları çalışmada konvansiyonel yöntemlerle % 23,4 oranında etken saptanırken PZR ile bu oranın % 41,6'ya yükseldiğini bildirmişlerdir. En sık saptanan mikroorganizma *S.pneumoniae* olmuş (%25), bunu *H.influenzae* ve *M.pneumoniae* (%7), gram-negatif basiller (%7,8), *M.catarrhalis* (%4,7), *C.pneumoniae* (%3,2), *L.pneumophila* (%1,6) ve *S. aureus* (%1,4) izlemiştir (Kurutepe 2012). Çalışmamızda TKP tanısı alan olguların kültür ile % 28,6'sında etken saptanabilirken PZR ile bu oran % 60,5 olarak saptanmıştır. Her iki yöntemle de en sık saptanan mikroorganizma *S.pneumoniae* olmuştur.

Çalışmamızda tüm ASYE olgularında, kültür yöntemi ile % 31,5'inde en az bir veya birden fazla bakteri üremesi saptanırken bu oran PZR ile % 63,5'e yükselmiştir. Bu artışın sebepleri arasında kültür ortamlarının seçiciliği nedeniyle birden fazla organizmanın kültürde üremesinin engellenmesi, PZR ile saptadığımız atipik bakterilerin kültürde araştırılmaması ve kültür ile üretemediğimiz *H. influenzae* 'nin PZR da gösterilmesi sayılabilir.

ASYE etkenlerini tanımlamak için yetişkinlerde balgam kültürü kullanılırken çocuklarda balgam alınması mümkün olamamaktadır. Genel olarak invaziv yöntemlerle alt solunum yolu örneği almak rutinde önerilmemekte, sadece tedaviye yanıtız hastalarda kullanılmaktadır. Bu durumlarda alt solunum yolu enfeksiyonu olan kişilerde etyolojiyi belirlemek için genellikle nazofarengeal sekresyonların kullanılmasını gerekli kılar (Murdoch 2005). Fakat test sonuçlarının dikkatli analiz edilmesi gereklidir, çünkü *S.pneumoniae*, *H.influenzae* gibi bakteriler sağlıklı çocukların nazofarengeal sekresyonlarında kolonize halde bulunabilir. Bu yüzden pozitif sonuçların radyolojik, klinik semptom ve bulgularla desteklenmesi gereklidir (Morozumi 2006). Çalışmamızdaki nazofarengeal sürüntü örneği

alınan çocuk hastalarının hepsinde akut alt solunum yolu enfeksiyonunu düşündüren lökosit, sedimentasyon, CRP artışı gibi laboratuvar bulguları, radyolojik ve klinik semptomları vardı.

Lieberman ve arkadaşları alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarla sağlam kişilerin nazofarengeal sekresyon örneklerini konvansiyonel metotlarla karşılaştırdıkları çalışmada, ASYE olan hastaların % 19'unda *S.pneumoniae*, % 12,3 *H.influenzae*, % 16,8'inde *M.catarhallis* saptarlarken kontrol grubunda bu oranları sırası ile % 4,1 ve % 11 olarak saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda *S.pneumoniae* oranlarını diğer çalışmalarla uyumlu bulurken kontrol grubundaki *H.influenzae* ve *M.catarhallis* oranlarını daha yüksek olarak bildirmişlerdir. Bu durumu da her hasta için üç farklı örnekle çalışmalarına bağlamışlardır.

Akut alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocukların nazofarengeal sürüntü örneklerinde PZR ile *H. İnfluenzae* araştırılan bir çalışmada hastaların % 62,9' unda bu bakteriyi saptarlarken kontrol grubunda bu oranı % 12,6 olarak bulmuşlardır (Gotoh 2008). Yine akut solunum yolu enfeksiyon bulguları olan 1700 çocuk hastanın nazofarengeal sürüntü örneklerinin toplandığı ve PZR ile bakteriyel etkenlerin araştırıldığı çalışmada, vakaların % 49,6'sında bakteriyel etken saptamışlardır. Saptanan bakteriler içinde en fazla bulunan, %24,4 saptanma oranı ile *S.pneumoniae* olmuş, bunu *M.pneumoniae* ve *H.influenzae* takip etmiştir (Hamano 2008). Cho ve arkadaşları nazofarengeal sürüntü örneklerinde PZR ile atipik bakterileri aramışlar ve hastaların % 3,7'sinde *M.pneumoniae* saptarlarken *L.pneumophila* ve *C.pneumoniae* hiç saptayamamışlardır (Cho 2012). Klinik ve radyolojik olarak pnömoni tanısı alan çocuk hastalarda PZR kullanarak yapılan başka bir çalışmada; nazofarengeal aspirat örneklerinin % 70'inde bir veya daha fazla patojen izole etmişlerdir ve bu patojenlerden en fazla saptananı % 54 ile *S.pneumoniae* olmuş bunu % 38 ile *H.influenzae* takip etmiştir. Çalışmamıza aldığımız nazofarengeal sürüntü örneklerinde, kültür ile % 22,2'sinde etken saptanırken PZR ile % 53,7'sinde etken saptanmış olup sonuçlarımız diğer çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur. Ancak çalışmamıza sağlıklı kontrol grubu almadığımızdan kolonizasyon oranları hakkında bir bilgi elde edilememiştir.

*S.pneumoniae* çocuk ve yetişkinlerin her ikisinde de pnömonilerin ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının en sık sebeplerindendir. Çocuklarda nazofarinkste *S.pneumoniae* kolonizasyonu sık saptanır ve invaziv enfeksiyonlar için kaynak oluşturabilir (Kellner 1998). Sağlıklı çocuklarda pnömokok kolonizasyonu; ülkemizde yapılan bir çalışmada % 8,5, İtalya' da yapılan bir çalışmada ise % 8,6 olarak saptanmıştır (Bakır 2002; Marchisio 2002). Solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda bu oran % 50'lere çıkmaktadır (Varon 2000). İlki ve

arkadaşlarının kültür yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ASYİ olan çocuklarda bu oranı % 28 olarak bulmuşlardır (İlki 2004).

Johanson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PZR kullanılarak balgam örneklerinde *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *M. catarrhalis* % 67 oranında saptarken balgam kültürü ile bu bakterileri saptama oranlarını % 26 olarak bildirmişlerdir. Bu bakteriler içerisinde de en sık saptanan bakteriyi, % 38 ile *S.pneumoniae* olarak bildirmişlerdir (Johanson 2010).

ASYE olan hastalardan alınan balgam ve bronşial lavaj örneklerinden, kültür yöntemi ile PZR yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada; PZR ile çok daha yüksek oranda patojen saptamışlardır. Kültür yöntemi ile örneklerin % 23 ünde, PZR ile % 37,7' sinde etken saptarlarken, her iki yöntemin kombine kullanılması ile bu oranı % 43,7 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada PZR ile saptama oranı en fazla artan bakteri % 6,4 ile *H.influenzae* olmuştur (Kais 2006). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde PZR ile saptanma oranı en fazla artan bakteri *H.influenzae* olmuştur. Rutinde kullanılan besiyerleri, bakterinin üremek için özel faktörler gerektirmesi, bakterinin konvansiyonel metotlarla saptanmasını zorlaştırmaktadır.

Morozumi ve arkadaşları toplum kökenli pnömoni tanısı alan çocuk ve yetişkin hastaların balgam örneklerinde PZR ile kültür metotlarının sensitivite ve spesifitesi karşılaştırdıkları çalışmada; PZR' nin sensitivitesini ve spesifitesini *S.pneumoniae* için % 96,2-93,2; *H.influenzae* için % 95,8-% 95,4; *M.pneumoniae* için serolojik yöntemlerle kıyaslandığında %90,2 ve %97,9 olarak bildirmişlerdir (Morozumi 2006).

İngiltere ve Avustralya'da yapılan bir çalışmada, radyolojik olarak akciğerde infiltrasyonları olan çocuk hastaların BAL sıvısından kültür ile bakteriyel ve viral etken aranmış aynı zamanda BAL örnekleri PZR yöntemi ile de çalışılmıştır. Toplam 95 hastanın %62'sinde tek veya çoklu etken saptanmış, BAL kültürü ile sadece 2 hastada etken (1 *S.pneumoniae*, 1 *H.influenzae* tip b) saptarken PZR yöntemi ile hastaların %37,8'inde bakteriyel etken (31 *S.pneumoniae*, 5 *H.influenzae* tip b) saptamışlardır. Yine PZR ile hastaların % 25,2'sinde viral etken, sadece % 2,1'inde ise *C.pneumoniae* saptarlarken *M.pneumoniae* hiç saptayamamışlardır (Carrol 2011).

Etken saptamada PZR ile kültür yönteminin sensitivite ve spesifinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, PZR yönteminin *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* tanımlamasında spesifitesini %94-98; sensitivitesini %100 olarak bulmuşlardır. Kültür sonucu negatif gelen 448 hastanın 46



tanesinde PZR ile (27 tanesinde *S.pneumoniae*, 9 tanesinde *H.influenzae*) etken saptamışlardır (Luo 2012).

Çalışmamızda en fazla saptanan etken mikroorganizma kültürde % 16,9 ile *S.pneumoniae* oldu. Bu oran PZR ile % 32 olarak saptandı. Kültür altın standart olarak kabul edildiğinde PZR'nin sensitivitesi % 96 olarak bulundu. Bu sonuç yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu idi.

*M.pneumoniae*, *L.pneumophila*, *C.pneumoniae* en sık saptanan atipik pnömoni etkenleridir (Blasi 2004, Cunha 2006). *M.pneumoniae* tanısı için kullanılan standart tanı yöntemleri, kültür ve serolojidir. Ancak bakteri besiyerinde geç (3-6 hafta) ve güç ürer. Serolojik tanıda daha çok kompleman fiksasyon yöntemi kullanılır. Bu testin dezavantajı ise diğer mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon vermesidir. Atipik etkenlerin tanısında kullanılan kültür ve serolojik yöntemlerin rutin uygulamasındaki güçlükler nedeniyle, ülkemizde bu etkenlere yönelik veriler sınırlıdır. Ülkemizden bildirilen dört çalışma sonucunda atipik bakteri oranları, % 20, % 26, % 15, % 5,5'dir (Saltoğlu 1999; Özlü 2000, Köksal 2010, Kurutepe 2012). Köksal ve arkadaşları oranlarındaki yüksekliği çalışmalarında atipik bakterileri saptamak için kültür, seroloji ve moleküler yöntemleri eş zamanlı kullanmalarına bağlamışlardır.

Son yıllarda gelişen moleküler tanı metotları sayesinde solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan atipik patojenler daha sık saptanmaya başlamıştır. Bu testlerin sensitivite ve spesifitesi diğer yöntemlere göre anlamlı derecede yüksektir. PZR ile etken saptanmasında nazofarengeal sekresyon, faringeal svap, balgam, endotrakeal aspirat, plevral sıvı kullanılabilirlikle birlikte balgam ve bronkoalveoler lavaj sıvısının sensitivite ve spesifitesi daha yüksektir (Boman 1997, Waris 1998).

Farklı ülkelerden ise TKP olgularında atipik etkenler %3-66 arasında değişen geniş bir aralıkta bildirilmiştir (Lieberman1996, Lui G 2009, Cho 2012). Bu sonuçların değişkenliğinin, coğrafi bölge farklılıkları kadar kullanılan yöntem farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada atipik etkenlerin saptanmasında sadece PZR yöntemi kullanıldı ve hastaların % 2,5'inde *M.pneumoniae*, % 0,5'inde *C.pneumoniae* saptanırken, *L. pneumophila* hiç saptanamadı. Atipik bakteri saptadığımız tüm hastalar toplum kökenli pnömoni tanısı alan hastalardı. Oranlarımızın diğer çalışmalara göre biraz daha düşük olması, sadece tek yöntem

kullanmamıza bağılı olabilir. Kurutepe ve arkadaşları PZR kullanarak bu oranı % 5,1 olarak saptarken seroloji, immun florasan gibi ek yöntemler kullandıklarında bu oranı % 11 olarak saptamışlardır (Kurutepe 2012).

Welti ve arkadaşları alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların çeşitli solunum yolu örneklerinden (nazofarengeal sekresyon, faringeal svap, balgam, endotrakeal aspirat, plevral sıvıda yaptıkları çalışmada PZR ve serolojik yöntemlerle 38 hastada *M.pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C.pneumoniae* tespit etmişlerdir. 38 hastanın 14 tanesi her iki yöntemle de pozitif bulunmuştur (1 *C.pneumoniae*, 10 *L.pneumophila*, 3 *M.pneumoniae*). Çalışmanın sonucunda atipik bakteriler gibi yavaş ve güç üreyen bakterilerin aynı anda ve hızlı tespitinde moleküler yöntemlerin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

1700 pnömoni tanısı almış çocuk hastadan alınan nazofarengeal aspirat örneklerinde PZR ile viral ve atipik bakterilerinde dâhil olduğu etkenlerin araştırıldığı çalışmada, hastaların % 11,3'ünde *M.pneumoniae*, % 1,4'ünde *C.pneumoniae* saptamışlardır. Çocuklardan balgam toplamak zor olduğu için PZR'ın nazofarengeal numunelerle çalışılabileceğini, virüs ve atipik bakterileri saptamada bu numunelerin uygun olacağını bildirmişlerdir (Hamano 2008).

Pnömoni tanısı almış 389 hasta üzerinde yapılan çalışmada, nazofarengeal aspirat ve balgam örneklerinde PZR yöntemi ile % 39,8 hastada bakteri ya da atipik patojen saptanmış olup bunların % 24,7'sinde bakteri saptanırken % 9,8' inde atipik patojen, % 5,6'sında ise bakteri ve atipik bakterilerin her ikisi birden saptanmıştır. Serolojik yöntemlerle 18 olguda *M.pneumoniae*, 11 olguda *C. pneumoniae* ve 2 olguda *L. pneumophila* saptanırken bu yöntemlere PZR eklenince bu sayılar sırası ile 42, 17, 2'ye yükseldiği bildirilmiştir (Huang 2006).

Morozumi ve arkadaşları pnömonili çocuk ve yetişkin hastaların balgam örneklerinde PZR ile kültür metotlarının sensitivite ve spesifitesi karşılaştırdıkları çalışmada; PZR nin sensitivitesini ve spesifitesini *M.pneumoniae* için %100- %95,4 olarak bildirmişlerdir (Morozumi 2006). Miyashita ve arkadaşları 1999- 2000 yılları arasında Japonya'da pnömoni ön tanısı alan 208 hastanın nazofarengeal sürüntü örneklerinde tipik ve atipik bakteriler için geliştirilen PZR yöntemi ve konvansiyonel metotlarla etken araştırdıkları çalışmada; 15 olguda *C.pneumoniae*, 10 olguda *M.pneumoniae*, 8 olguda *L. pneumophila* saptamışlardır. Aynı zamanda bu örneklerin tamamı PZR yöntemi ile de çalışılmış, konvansiyonel metotlarla pozitif bulunan 31 tane atipik bakteri (13 *C.pneumoniae*, 9 *M.pneumoniae*, 8 *L. pneumophila* ve 1

*C.pneumoniae* + *M.pneumoniae*) PZR yöntemi ile de pozitif bulunmuştur. Konvansiyonel metotlarla negatif bulunan 11 hasta ise PZR ile pozitif olarak bulunmuştur (Miyashita 2004). Çalışmamızda atipik patojenleri tek bir yöntem kullanarak tespit ettiğimiz için yöntemlerin sensitivite, spesifite açısından karşılaştırma yapılmadı.

Bazı patojenlerin sıklığı yaşla ilişkilidir. Yeni yorumlar *S.pneumoniae*'nin çocuk ve yaşlılarda orta yaşlı yetişkinlerden daha sık görüldüğü şeklindedir. Buna ek olarak Enterobactericea ailesi daha çok yaşlılarda etken iken atipik patojenler daha çok çocuklarda etkindir (Wubbel 1999, Jokinen 2001).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatırılarak tedavi edilen 291 TKP olgusunda 60 yaşın üzerindeki hastalarda etken olarak *H. influenzae*, *S.aureus* ve enterik Gram negatif bakteriler genç olgulara kıyasla daha sık saptanmıştır.

Bu çalışmada kültürde üreme oranları açısından çocuk ve yetişkin arasında anlamlı farklılık gözlemlendi. Çocuk hastaların % 17'sinde üreme saptanırken, yetişkin hastaların %35'inde üreme saptandı. Her iki grupta da en çok üreyen bakteri *S.pneumoniae* olup, atipik bakterilerin tümü çocuklarda saptanırken *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *S. aureus* sıklıkla yaşlı hastalarda saptandı.

Çalışmaya alınan olguların % 23,3'ünde birden fazla etken saptanmış olup farklı çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Akın ve arkadaşları, bu oranı 27,4; Kurutepe ve arkadaşları %10,9 olarak bildirmişlerdir. Yurt dışından bildirilen sonuçlarda bizim sonuçlarımızın benzer olduğu gözlemlendi. Wang ve arkadaşları, ASYE tanısı alan 5 yaş altı çocukların solunum yolu örneklerinde PZR ile % 35 oranında çoklu bakteri saptamışlardır (Wang 2008). Lieberman ve arkadaşları, pnömonili hastaların %33'ünde, diğer ASYE olan hastaların % 35'inde çoklu patojen saptadıklarını bildirmişlerdir (Lieberman 2007). 2011 yılında Malezya'da yapılan bir çalışma sonucu bu oran %17,7 olarak bildirilmiştir (Mustafa 2011). Japonya'da 141 pnömoni ön tanısı alan çocuk hastayla yapılan çalışmada, nazofarengeal svap örneğinin 42 tanesinde PZR ile çoklu patojen saptanmıştır (Bamba 2006). Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da en sık saptanan çoklu bakteri; *S.pneumoniae* ve *H. influenzae* birlikteliği oldu

Çalışmamızda 2 olgu hariç kültürde saptanan etkenlerin tümü, PZR'de de saptandı. Bu durum numunelerde PZR'yi inhibe edebilecek faktörlerin bulunması ile açıklanabilir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda CTX-M enzimlerinin baskın hale geldiği ve özellikle *E.coli* türlerinde bu enzimlerin sık görüldüğü bildirilmiştir (Paterson 2005). Pallecchi ve arkadaşları 2005 yılında 50 *E.coli* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların 44'ünde PZR yöntemiyle CTX-M enzim pozitifliği saptamışlardır (Pallecchi 2007). Brigante ve arkadaşları İtalya'da 5 yıl süresince topladıkları izolatlar ile yaptıkları çalışmalarında, 200 GSBL pozitif izolatın 53'ünde CTX-M enzimi saptamışlar ve bu sıklığı oksiiinosefalosporin kullanımının yaygınlığına bağlamışlardır (Brigante 2007). Mugnaioli ve arkadaşları, PZR yöntemiyle GSBL pozitif saptanan Enterobacteriaceae suşlarındaki CTX-M enzim pozitifliğini %19,7, *E.coli* suşlarında ise %54,8 olarak bildirmişlerdir. GSBL üreten *E.coli* suşları arasında CTX-M enzim prevalansı 1999 yılında İtalya'da %12,5, 1998 yılında Avusturya'da % 0 iken, takip eden yıllarda artarak 2003 yılında İtalya'da % 38,2, 2004 yılında Avusturya'da % 85'e yükseldiğini gözlemlemişlerdir (Mugnaioli 2006). Ülkemizde 2004-2005 yılları arasında Gür ve arkadaşları tarafından yapılan bir sörveyans çalışmasında, GSBL üreten kan izolatlarının %71,4'ünde CTX-M türleri gösterilmiştir (Gür 2008). Gülay ve arkadaşlarının 2002-2003 yıllarında yedi farklı merkezden topladıkları GSBL üreten izolatlar ile yaptıkları çalışmada, CTX-M sıklığı *E.coli* izolatlarında %76, *K.pneumoniae*'de %83, *Enterobacter spp.* izolatlarında ise %50 olarak bulunmuştur (Gülay 2004). Aktaş ve arkadaşları, *E.coli* izolatlarının tamamında, *K.pneumoniae* izolatlarının ise %47'sinde CTX-M enzim varlığı bildirmişlerdir (Aktaş 2004). Bu çalışmada saptanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının hiç birisinde PZR ile direnç geni saptanamamıştır. Çalışmaya alınan solunum yolu örneklerinde saptadığımız bu bakterilerin antibiyotik duyarlılığında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz mevcut değildi. Elde edilen bu veriler, saptanan mikroorganizma sayılarının çok düşük olması nedeniyle direnç genlerini gösterme açısından yeterli olmadığı düşünüldü.

New Delhi metallo-beta-laktamaz-1 (NDM-1) üretebilen patojenlerin ortaya çıkması dünya genelinde önemli bir problemdir. NDM-1 üreten bakteriler, birçok diğer antibiyotik gruplarına olduğu gibi, karbapenemleri de içeren beta-laktamlara oldukça dirençlidir. Bu geniş spektrumlu direnç, NDM-1 üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Ülkemizde, Poirel ve arkadaşlarının yayınladıkları olgu bildirisinin dışında NDM-1 varlığıyla ilgili veri bulunmamaktadır (Poirel 2012). Yanık ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 210 karbapenem dirençli Gram negatif suş taranmış, ancak hiçbirinde bu geni saptayamadıklarını bildirmişlerdir (Yanık 2013). Bu çalışmada PZR ile *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarının hiç birinde NDM geni saptanamadı. Bu sonuçlar NDM-1 varlığının ülkemizde henüz yaygın olmadığına işaret etmektedir. Ancak, NDM-1 plazmid ile kodlanan bir

enzim olduğundan ve farklı coğrafyalar arası insan seyahatleri giderek arttığından, bu direncin ülkemizde de bakteriler arasında yayılma riski bulunmaktadır. Dolayısıyla, NDM-1 varlığını düşündüren antibiyotik direnç paternine sahip karbapenem dirençli izolatların araştırılması ve antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrol politikalarının izlenmesi, NDM-1 üreten bakterilerin tanımlanmasını ve yayılımlarının engellenmesini sağlayacaktır.

*S.aureus* suşlarında metisilin direncinin tanımlanması ve doğrulanması için birden fazla yöntem bulunmakla birlikte konvansiyonel yöntemlerle sonuç verme süresi 2-4 gün arasında değişmektedir (Özen 2011). Direncin belirlenmesinde altın standart, *mecA* geninin PZR ile gösterilmesidir; ancak özel laboratuvar ortamı gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımı uygun değildir (Cesur 2010). *mecA* geninin saptanmasının her laboratuvarda uygulanamaması nedeniyle, kolay uygulanabilir diğer yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır (Cesur 2010). Bu sebeple metisilin direncinin saptanmasında PZR ile *mecA* genin belirlenmesini altın standart olarak kabul edilerek yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %95- %100; özgüllüğü % 89-% 96 arasında bildirilmiştir ( Atay 2002, Çiftçi 2009).

Bu çalışmada, *mecA* geni saptanamadı. Çalışmada saptanılan *S.aureus* suşlarının hepsi metisilin duyarlı bulundu. Saptanılan bakteri sayısının az olması nedeniyle sonuçlarımızın direnç genini saptama açısından tatmin edici olmadığı düşünüldü.

## 6. SONUÇ:

Alt solunum yolu önemli mordite ve mortalite nedenidir ve bu hastalarda uygun olmayan tedaviler hem mortaliteyi hem de komplikasyonları artırmaktadır. Bu nedenle etyolojik tanı, prognoz ve tedavi açısından önemlidir. Ancak konvansiyonel yöntemlerle etken saptanması uzun süre almakta, bu durumda hastaya ampirik tedavi başlanmasına sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı hızlı tanı yöntemlerine gerek duyulmuştur. Moleküler tetkikler bu tür hastalarda çok hızlı etyolojik ajan saptanmasına imkân sağlamıştır. Yine bu yöntemin önemli avantajları arasında, aynı anda birden fazla etkenin saptaması ve hastanın antibiyotik alımından etkilenmemesidir. Hastanın antibiyotik alımı kültürde yalancı negatifliklere neden olabilmektedir.

Bizim çalışmamızda kullandığımız multipleks PZR alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık rastlanan atipik etkenlerinde içinde olduğu 10 bakteriyel ajanı ve bunlara ait direnç genlerini saptamaya yönelik geliştirilmiştir. Ortalama 6 saatte sonuç vermektedir. Hızlı ve duyarlı sonuç alınabilmesine rağmen bazen örneklerdeki inhibitörler DNA kalitesini düşürebilmekte ve yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Bundan dolayı şüpheli sonuçların kültürle doğrulanması gereklidir. Bazen kültürde tespit edilen ancak PZR menüsünde olmayan mikroorganizmaları tespit edememektedir. Bu durumlarda moleküler yöntemleri duyarlılığı azalmaktadır. Moleküler yöntemlerin maliyeti kültüre göre daha yüksek olmaktadır. Ancak direkt etkene yönelik tedavi başlanması, doğru ajanla tedaviyi sağlamakta, sık tedavi değişikliğini engellemekte ve erken tedavi ile hastaneye yatış oranlarını azaltarak hasta maliyetini düşürmektedir. Moleküler yöntemler ile etkene yönelik antibiyotik duyarlılığı saptanamamaktadır.

Bizim çalışmamızda kullanılan multipleks PZR yöntemi, konvansiyonel tanı yöntemlerine katkı sağlayarak, ASYE olan hastalarda bakteriyel etyolojinin belirlenmesinde önemli artış sağlamıştır. Ancak maliyet yüksekliği nedeniyle öncelikli olarak klinik tablosu tedavi başlanmasını gerektirecek uygun hastalarda kullanılmalıdır. Ayrıca çalışmamızın verileri, bölgemizde genel olarak ASYE tanısı almış hastaların başlangıç tedavisinin *S. pneumoniae* ve *H. Influenzae* 'yı kapsamaması gerektiğini göstermiştir.

Tablo 6.1.ASYE hastalarının solunum örneklerinde PZR ve kültür ile etken saptanma oranları

Makale/yıl	PZR	Kültür	Örnek	Örnek sayısı
Mustafa/2011	%65.2	%39.1	Balgam	46
Templeton/2005	%89	%43	Balgam	180
Wang/2008	%70	%26	NFS	100
Johanson/2010	%67	%26	Balgam	124
Kais/2006	%37.7	%23	Balgam-BAL	46
Carrol	%37	%12	Balgam	95
Hamano/2008	%49.6	-	NFS	1700
Kurutepe/2012	%41.8	%23.4	Balgam-BAL	128
Akın/2011	%75.1	%17.7	Balgam	65
Bizim çalışmamız	%63.5	%31.5	Balgam, BAL, NFS	197

Tablo 6.2.ASYE hastalarının solunum örneklerinde PZR ile atipik bakteri saptanma oranları

Yazar-yıl	Örnek	<i>M. pneumoniae</i>	<i>C.pneumoniae</i>	<i>L.pneumophila</i>	n
Ginevra/2005	NFS, balgam, BAL	5.8	1.2	12.3	154
Huang/2006	Balgam	10.7	4.3	0.5	389
Stralin/2006	NFS, balgam	19.1	2.1	-	235
Hofman/2012	NFS, balgam	0.3	0.6	-	295
Hamano/2008	NFS, balgam	14.8	1.4	-	1700
Johanson/2012	Balgam	4.3	-	0.5	184
Morozumi/2006	Balgam	12.5	-	-	429
Wang/2008	NFS	3	1	-	100
Martinez/2008	Balgam	6.4	-	-	357
Bamba/2006	NFS, balgam	40	2.8	-	141
Bizim çalışmamız	NFS, balgam, BAL	2,5	0,5	-	197

## 7- KAYNAKLAR:

- Abdeldaim GM, Strålin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiol.* 2010;10:310
- Andre S, Correia J, Abreu M. Community-acquired pneumonia in a Pneumology Department. *Rev Port Pneumol.* 2003; 9(5): 9- 10.
- Angrill J, Agusti C, Celis R. Bacterial colonization in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. *Thorax.* 2002; 57: 15- 19.
- Akın B, Tülek B, Arslan U, Fındık D, Süerdem M. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı alevlenmelerinde balgamda *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'in gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile kantitatif olarak saptanması. *Solunum* 2011; 13(1): 32–40
- Aktaş Z, Gönüllü N, Şalcıoğlu M, Bal Ç. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'da genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların isoelectric focusing ve PCR ile araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. 8-10 Nisan 2004, İstanbul. Poster No.19.
- Aktaş Z, Gönüllü N, Schneider I, Bal Ç, Bauernfeind A. Hastanede yatan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *Escherichia coli* suşunda CTX-M-15 tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazın tanımlanması. *Mikrobiyol bul* 2005; 39: 421-429.
- Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl 3): 165-70.
- Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve *mecA* gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol bul.* 2002; 36:133- 140.
- Aydoğdu M, Ozyılmaz E, Aksoy H, Gürsel G. Mortality prediction in community acquired pneumonia requiring mechanical ventilation; values of pneumonia and intensive care unite. *Tuberk Toraks.* 2010; 58(1): 25- 34.
- Bamba M, Jozaki K, Tamai NSS, Ishihara J, Cho H, Okano ANY, et al. Prospective surveillance for atypical pathogens in children with community-acquired pneumonia in Japan. *J Infect Chemother.* 2006; 12: 36–41.



- Bakır M, Yağcı A, Akbenlioğlu C, İlki A, Ülger N, Söyletir G. Epidemiology of *S.pneumoniae* pharyngeal carriage among healthy Turkish infants and children. Eur J Pediatr. 2002; 161: 165- 66.
- Bakır M. *Haemophilus influenzae* immünoloji ve epidemiyolojisi, Ankem Dergisi. 2003; 17(3): 286- 88.
- Baum SG, Mandell GL, Bennett JE, Mandell RD, eds. Introduction to *Mycoplasma pneumoniae*. Douglas and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. 2000; 1: 2015- 27.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı. İzmir: Barış yayınları; 2009: 337-40.
- Brigante G, Luzzaro F. Evolution of CTX-M type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. J Antimicrob Agents 2005; 25: 157-62
- Blasi F. Atipik pathogens and respiratory tract infections. Eur Resp J 2004; 24: 171- 81.
- Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell, G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. J Infect Dis 1997; 175: 1523–26.
- Boman J, Gaydos CA, Quinn T C. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1999; 37: 3791–99.
- Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association: Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56:1000-18.
- BTS Guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults. Thorax 2001; 56: 1- 64.
- Carrol E, Limangeni A, Mankhambo, Guiver M, Banda D, et al. PCR Improves diagnostic yield from Lung aspiration in Malawian Children with radiologically confirmed pneumonia. PLoS ONE 2011; 6(6): e21042.
- Cesur S, Yildiz E, Irmak H, et al. Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol bul 2010; 44(2): 279-84.
- Cho M, Kim H, An D, Lee M, Noh S. et al. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. Ann Lab Med. 2012; 32(2): 133- 38.

- Cunha BA. The atypical pneumonias: Clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(3): 12- 24.
- Cunha BA. Community-acquired pneumonia: reality revisited. *Am J Med* 2000; 108: 436- 8.
- Curran T, Coyle PV, McManus TE, Kidney J, Coulter WA. Evaluation of real-time PCR for the detection and quantification of bacteria in chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50(1): 112- 8.
- Çiftçi İH, Altındış M, Çetinkaya Z, Gülşah A, Aktepe OC, Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda mecA Varlığının Araştırılması; *Kocatepe Tıp Dergisi* 2009;10: 17- 20.
- Dorigo-Zetsma J.W, Zaat S.A, Dillen P. M, L Rijntjes, J van Waveren, G Jensen J, at. all. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 14–17.
- Durmaz R, *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*; 2001; 2. Baskı: 21- 35.
- Edwards M C, Gibbs R A. Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 1994; 3: 65–75.
- Ertem E, Gokengin D. Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M, Klamidya İnfeksiyonları. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*, 2. baskı. Nobel TıpKitapevleri 2002: 1411- 27.
- File T. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003; 362:1991– 2001
- Greiner O, Day PJ, Bosshard PP, Imeri F, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3129- 34.
- Gencay M, Dereli D, Ertem E. Prevalance of *Chlamydia pneumoniae* specific antibodies in different clinical situations and health subjects in İzmir, Turkey. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 505- 9.
- GOLD Executive committee. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD. (Available at:<http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp?l112&l211&intId1989>. Accessed: September 2013.
- Gotoh K, Qin L, Watanbe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, et al. Prevalence of haemophilus influenzae with resistant genes isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. *J Infect Chemother* 2008; 14: 349- 53.
- Günlügür U, Akkurt İ, Bakıcı MZ, Sümer H. Sivas'ta toplum kökenli pnömonilerde bakteriyel etiyoloji. *Akciğer Arşivi* 2001; 4: 143- 8.

- Gur D, Gulay Z, Arıkan Akan O, et al. Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre Hitit study. *Mikrobiyol bul* 2008; 42: 537-44.
- Gülay Z. Toplum kökenli pnömoni tanısında mikrobiyolojik incelemelerin yeri ve önemi, *İç Hastalıkları Dergisi*. 2007; 14(4): 195- 205.
- Gülay Z, Terek G, Erac B. High prevalence of CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in members of Enterobacteriaceae in Turkey. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). May 1-4, 2004, Prague. Poster No.752
- Hacievliyagil SS, Mutlu LC, Gülbaş G, Mutlu Ö. Göğüs hastalıkları servisine yatan hastaların hastane yatış maliyetlerinin karşılaştırılması. *Toraks Derg* 2006; 7: 11- 16.
- Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins M K, Aubry M C, Limper A H, Lloyd R V, Cockerill FR. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of lightcycler pcr, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2618–26.
- Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 67-74.
- Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG. Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med*. 2004;164(6):637-44.
- Huang HH, Zhang YY, Xiu QY, Huang SG, Lu Q, Wang DM. Community-acquired pneumonia in Shanghai: Microbial etiology and implications for empirical therapy in a prospective study of 389 patients: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 369- 74.
- Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 2008; 14: 424–32.
- İlke A, Akbenlioğlu C, Yağcı A, Söyletir G. Solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda nazofarinkste *S.pneumoniae* kolonizasyon epidemiyolojisi. *Mikrobiyoloji bul* 2004; 38: 1- 7.
- Jacobs E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: A critical review of current procedures. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 79- 82.
- Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske C, Hedlund J, Etiology of Community-Acquired Pneumonia: Increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50: 202–09.

- Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in eastern Finland. *Am J Epidemiol* 1993; 137: 977-88.
- Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Kleemola M, et al. Microbial etiology of community-acquired pneumonia in the adult population of 4 municipalities in eastern Finland. 2001; *Clin Infect Dis* 2001; 32(8): 1141-54.
- Kais M, Spindler C, Kalin M, Giske CG, Quantitative detection of *S.pneumoniae*, *H. Influenzae*, *M.catarhallis*, samples by real time PCR, *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55(3): 169-78
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(6): 1549-55.
- Kellner JD, Mcgeer A, Centron MS. The use of *S.pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children to predict features of invasive disease. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 279-86.
- Klaus FR, Hurd S, Anzueto A. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176: 532- 55.
- Köksal I, Bayraktar O, Etiological agents of community acquired pneumonia in adult patients in Turkey, a multicentric study, *Tuberk toraks* 2010; 58(2): 119- 27.
- Kolsuz M, Uçgun İ, Metintaş M. Hastaneye yatarak veya yoğun bakımda tedavi görmesi gereken toplum kökenli pnömonilerde hastanede yatış süresini etkileyen faktörler ve maliyet. *Solunum Hastalıkları Dergisi* 2001; 12: 1- 7.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Chlamydia pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, 1997: 1264- 5.
- Kuoppa Y, Boman J, Scott L, Kumlin U, Eriksson I, Allard A. Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae*; Infection by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 2273–2274
- Kurutepe S, Ecemiş T, Özgen A, Biçmen C, Çelik P, Özkan S, Sürücüoğlu S. Toplum kökenli pnömonisi olan erişkin hastalarda konvansiyonel ve Multipleks PCR yöntemleriyle bakteriyel etyolojinin araştırılması. *Mikrobiyol bul*. 2012; 46(4): 523-531.
- Küçükardalı Y, Öncül O, Nalbant S, Çankır Z, Top C, Ağdaş Ş,Şilt E, Danacı M. Yaşlı popülasyonda toplum kökenli pnömoni olguları. *Geriatric* 2001; 4: 59- 62

- Leverstein-Van Hall MA, Stuart JC, Voets GM. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:830–831.
- Lieberman D, Shimoni A, Shleyfer E, Castel H, Terry A, et al. Naso-and oropharyngeal potential respiratory pathogens in adult with nonpneumonic lower respiratory tract infection. *Diagn micr infec dis* 2007; 58: 147-151
- Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB: Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their mec regions, *Pathology* 2003;35(4): 336-43.
- Lui G, Ip M, Lee N, et al. Role of atypical pathogens among adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Respirology* 2009; 14(8): 1098- 105.
- Luo YC; Du P, Zhao JZ, Duan XJ, Hou YJ, Pan H, Shao SH. A multiplex touchdown PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b and *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum samples, *Tropical Biomedicine* 2012; 29(3): 422–28.
- Kais M, Spindler C, Kalinb M, Ortqvist A, Giske Christian G. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. *Diagn micr infec dis* 2006; 55: 169–78.
- Marty A, Greiner O, Philip J. R. Day, Sibylle Gunzinger, Mu'hlemann K, Nadal D. Detection of *Haemophilus influenzae* Type b by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3813–15.
- Marchisio P, Esposito S, Schito GC. Nasopharyngeal carriage of *S.pneumoniae* in healthy children. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 479- 86.
- McDade JE, Shepard DW, Eraser TR, Tsai M. Legionnaires disease; isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 1977; 297: 1197- 203
- McMillan JA. Rudolph CD, Rudolph AM, Hostetter MK, Lister G, Siegel NJ. *Mycoplasma Infections Rudolph's Pediatrics*. 21th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies. 2002; 21: 965- 67
- Miravittles M. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: When are bacteria important. *Eur Respir J* 2002; 20: 9- 19.
- Miyashita N, Saito A, Kohnoc S, Yamaguchi K, Watanabee A, Odaf H, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma*

- pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community acquired pneumonia  
Respiratory Medicine. 2004; 98, 542–550.
- Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, et al. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by Real-TimePCR with pathogen-specific molecular beacon probes. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1440–46.
- Mugnaioli C, Luzzaro F. CTX-M type extended spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2700- 6.
- Murdoch D.R, Diagnosis of *Legionella* infection. Clin. Infect. Dis. 2003; 36(1): 64- 69.
- Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 63–6.
- Murdoch DR. Impact of rapid microbiological testing on the management of lower respiratory tract infection. Clin Infect Dis 2005; 41: 1445–47.
- Murdoch D, Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections, APMIS 2004; 112: 713–27.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Lndry M, Pfaller M, Manual of Cinical Microbiology 9. Baskı, 2.cilt, Ankara: Atlas kitapçılık,2009: 319-21.
- Musher DM, Roig IL, Cazares G, Stager CE, Logan N, Safar H. Can an etiologic agent be identified in adults who are hospitalized for community-acquired pneumonia: results of a one-year study. J Infect. 2013;67(1):11-8
- Mustafa MI, Al-Marzooq F, How SH, Kuan YC, Ng TH. The use of multiplex real time PCR improves the detection of the bacterial etiology of community acquired pneumonia. Tropical biomedicine. 2011; 28(3): 531- 44.
- Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA et al. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163(7): 1730- 54
- Numazaki K, Sakamoto Y, Umetsu M, et al. Therapeutic effect of clarithromycin for respiratory tract infections in children caused by *Chlamydia pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents 2000; 13(3): 219- 222

- Özdemir L, Tabakoğlu E, Hatipoğlu ON. Bronşektazi olgularında sosyoekonomik özellikler ve predispozan faktörler. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2007; 24(2): 98- 100.
- Özen NS, Dağlar D, Özhak Baysan B. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *ANKEM* 2011; 25(1): 31-4
- Özlü T, Bülbül Y, Özsü S. Ulusal verilerle toplum kökenli pnömoniler. *Tuberk toraks*. 2007; 55(2): 191-12.
- Öztürk R, Eraksoy H, Yenen OŞ. Toplumda Edinilmiş Pnömoni: Tanı yöntemleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri 2000: 61- 64.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002; 37: 3- 8.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum betalactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2720-5.
- Pappalètera M, Aliberti S, Castelotti P, Ruvola L, Blasi F. Bronchiectasis: an update. *Clin Respir J* 2009; 3: 126- 34.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47(1): 25- 29
- Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices, *Drugs* 2010;70(3):313-33.
- Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5): 2784-5.
- Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000;117: 398- 401.
- Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl 3): 171- 6.
- Sidal M, Kilic A, Unuvar E, et al. Frequency of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Trop Pediatr* 2007; 53(4): 225- 31.

- Saltoğlu N, Taşova Y, Yılmaz G. Toplumdan edinilmiş pnömoni: Etyoloji, prognoz ve tedavi. *Flora* 1999; 4(4): 254- 252.
- She RC, Thurber A, Hymas WC, Stevenson J, Langer J, Litwin CM, Petti CA. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3380-2.
- Sherk PA, Grossman RF. The chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Clin Chest Med* 2000; 21: 705- 721.
- Stralin K, Tornqvist J.A, Kalsoft S, Olcen P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin. Microbiol* 2006; 44(2): 643- 645.
- Taşlı H, Bahar H. Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında SHV-2, SHV-5, SHV-12 VE CTX-M-3 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Saptanması. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30(5):1701- 6
- Taşova Y. Gram negatif enterik bakteri enfeksiyonlarının yönetimi. *ANKEM Derg* 2011; 25(Ek 2): 34-44
- Tarhan G. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri. *Güncel gastroenteroloji* 2002; 6(3):177- 183
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü, Başkent Üniversitesi Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyeti Etkinlik Projesi, 2004 ([www.toraks.org.tr](http://www.toraks.org.tr)).
- Templeton KE, Scheltinga SA, Eeden VD, Graffelman WC, et al. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005; 41(3): 345–351.
- Torres A, Serra-Battles J, Ferrer A et al. Severe community-acquired pneumonia. *Epidemiology and prognostic factors.* *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 312- 318.
- Tsolia M.N, Psarras S, Bossios A, Audi H, Paldanius M, Gourgiotis D,at all. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: Evidence for high prevalence of viral infections. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 139(5): 681–686
- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M, Asya Mikrobiyoloji, Asya Tıp Yayıncılık, 3. Baskı 2005
- Türk Toraks Derneđi Çocuklarda toplumda gelişen pnömoni tanı ve tedavi uzlaşı raporu, *Toraks dergisi* 2009; 10(3): 1-24
- Türk Toraks Derneđi Erişkinlerde toplumda gelişen pnömoni tanı ve tedavi uzlaşı raporu 2009;10(3): 1-16
- Türkiye İstatistik Kurumu, Sağlık İstatistikleri, 2004



- Uzaslan AEK, Akar B, Turan F ve ark. Kliniğimizde izlenen toplum kökenli pnömonili olguların retrospektif değerlendirilmesi. *Akciğer Arşivi* 2000; 1: 17-21.
- Wang Y, Kong Y, Yang Y, Gilbert G. A. Multiplex PCR- based reverse line blot hybridization assay for detection of bacterial respiratory pathogens in children with pneumoia. *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 150- 159.
- Varon E, Levy C, Rocque F. Impact of antimicrobial therapy on nasopharyngeal carriage of *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *Branhamella catarrhalis* in children, respiratory tract infections. *Clin inf Dis* 2000; 31(2): 477- 481.
- Waris M E, Toikka P, Saarinen T, Nikkari S, Meurman O, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3155–3159.
- Wedzicha JA. Exacerbations, etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002; 121:136- 141.
- Wellinghausena N, Straube E, Freidank H, Bauma H, Marrea R, Essig A. Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(7): 485–491.
- WHO. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html). Accessed September 2013
- Wubbel L, Muniz L, Ahmed A, Trujillo M, Carubelli C, et al. Etiology and treatment of CAP in ambulatory children. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18(2): 98–104.
- Yanık K, Emir D, Eroğlu C, Karadağ A, Güney AK, Günaydın M. Karbapeneme Dirençli Gram-Negatif İzolatlarda New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz-1 (NDM-1) Varlığının PCR ile Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(2): 382-384.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India, *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12): 5046-54.