

***Mycoplasma pneumoniae* Pnömonisi Tanısında Kullanılan Kültür, Enzyme Immunoassay ve Soğuk Aglütinasyon Testinin Karşılaştırılması**

**A. Bülent BEŞİRBELLİOĞLU, Levent GÖRENEK, Günay KAYA
Volkan ÖZGÜVEN, Aziz HACIBEKTAŞOĞLU**

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Çalışmamızda; klinik, laboratuvar ve radyolojik olarak toplumdan kazanılmış pnömoni düşünülen hastalardan "Protected Bronchoalveolar Lavage" (PBAL) yöntemi ile materyal alındı, aerop ve *Mycoplasma pneumoniae* için Pneumofast tanı kitine ekimler yapıldı. Serolojik incelemeler için bütün olgulardan serum örnekleri alınarak soğuk aglütinasyon testi (SAT) ve Enzyme Immunoassay (EIA) testinin tanı değerleri araştırıldı. Toplumdan kazanılmış pnömoni tanısı alan 60 olgu araştırmamıza dahil edildi ve bunların 56'sında (%93.3) etken izole edildi. PBAL tekniğinin invaziv bir örnek alma yöntemi olmasına karşın, orofaringeal kontaminasyonu önlemesi nedeniyle etken üretilmesi için uygun olduğu düşünüldü. Üreyen bakteriler içinde *M. pneumoniae* 11 olgu ile (%18.3) ikinci sıklıktaydı. Dört (%6.7) olguda ise etken üretilemedi. *M. pneumoniae* tanısında kullandığımız testlerden; SAT'nin özgüllüğü %91.84, duyarlılığı %54.55, EIA yönteminin ise özgüllüğü %97.96, duyarlılığı %100 olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler : *Mycoplasma pneumoniae*, Atipik Pnömoni, Hızlı Tanı

SUMMARY

The Comparison of Diagnostic Methods in the *Mycoplasma pneumoniae* Pneumoniae

In our study, the respiratory secretion samples taken by Protected Bronchoalveolar Lavage (PBAL) technique were collected from patients with community-acquired pneumonia diagnosed by means of clinical, routine laboratory and chest x-ray findings. Then those materials were inoculated in the standard aerobic media and in Pneumofast for *M. pneumoniae*. All patients' sera specimens were collected and tested for cold agglutination titers and *M. pneumoniae* IgM by EIA. Of 60 cases with community-acquired pneumonia, 56 (93.3%) were diagnosed microbiologically. Although PBAL technique is an invasive respiratory secretion collection method, this is a suitable technique for prevention from nasopharyngeal contamination. *M. pneumoniae* was identified in 11 (18.3%) cases. In 4 (6.7%) cases, we weren't able to identify any organism. Specificity of cold agglutination technique used in the diagnosis of *M. pneumoniae* was 91.84% and the sensitivity was 54.55%; those of EIA were 97.96% and 100%, respectively.

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae*, Atypical Pneumonia, Rapid Diagnosis

GİRİŞ

Mycoplasma pneumoniae pnömonisi dünyanın her yerinde ve yılın her döneminde görülebilmektedir. Solunum yolu damlacıkları ile bulaştığından sonbahar ve kış aylarında daha sıklıkla karşılaşılmaktadır. Toplumdan kazanılmış pnömonilerin %10-35'inden sorumludur ve ikinci sırada yer almaktadır. Ancak, askeri birlik ve kreş gibi kapalı ortamlarda yaşayanlarda bu oran artmakta ve %50'lere ulaşmaktadır (1-3). Diğer pnömoni etkenleri, iklimsel özelliklerden ileri derecede etkilenmekte ve yaz aylarında çok az sayıda pnömoni olgusuna rastlanmaktadır. Yaz aylarında karşılaşılan pnömoni olgularının hemen hemen yarısında sorumlu etken *M. pneumoniae*'dir (4). *M. pneumoniae*'nin 5-30 yaş grupları arasında sıklıkla infeksiyon oluşturduğu bilinmektedir (3). *M. pneumoniae* infeksiyonu seyrinde, hemen hemen bütün sistemlere ilişkin ekstrapulmoner komplikasyonlar görülebilir. Bu komplikasyonların görülme sıklığı, spektrumu ve oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Genellikle, pulmoner semptomlardan 1-23 gün sonra ortaya çıkar. Bazı olgularda ise geçirilmiş pulmoner infeksiyon öyküsü alınmaz (2).

M. pneumoniae infeksiyonunun tanısında bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Üst solunum yolu infeksiyonu öyküsünün bulunması, yavaş seyretmesi, konstitüsyonel semptomların pulmoner semptomlara nazaran ön planda olması, ekstrapulmoner bulguların varlığı; fizik muayene bulgularının, konsolidasyonun şiddeti ile paralellik gösterecek şiddette olmaması ve radyolojik bulguların fizik muayene bulgularına göre beklenenden daha belirgin olması öncelikle *M. pneumoniae* veya diğer atipik pnömoni etkenlerinin yol açtığı pnömonileri düşündürmelidir. Olguların %75-90'ında kanda lökosit (BK) sayısı normal sınırlardadır. Nötrofili, monositoz, lenfositoz veya lenfopeni saptanabilir. BK sayısının 15.000/mm³'den, periferik yaymada çomak formunun %10'dan az olduğu bir pnömoni olgusunda öncelikle *M. pneumoniae* pnömonisi akla gelmelidir. Eritrosit sedimantasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP) genellikle yüksektir (3,5). Akciğer grafisinde olguların çoğunda akciğer alt lobunda tek taraflı segmental infiltrasyon vardır. Atipik pnömoniyeye yol açan etkenin *M. pneumoniae* olduğunun tam olarak gösterilebilmesi için kültürde üretilmesi ya da serolojik yöntemlerle bazı ipuçlarının elde edilmesi gerekir. Mikroorganizmanın izolasyonu için transtrakeal aspirat (TTA), bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı ve bronkoskopi sırasında "protected specimen brush" (PSB) ile alınan bronşiyal sekresyon örneklerle

ri kullanılabilir. Boğaz sürüntüsü ve balgamdan kültür yapılması önerilmez (5-7). Mikroorganizmanın üretilmesinde sıklıkla önerilen besiyeri; glukoz, maya ekstresi ve agammaglobülinemik at serumu ile zenginleştirilmiş peptonlu heart infusion broth'dur (8). Üreyen mikroorganizmanın, β -hemoliz veya üreme inhibisyon testleri ile identifikasyonu yapılabilir. Uzun süre gerektirme ve kesin izolasyon sağlayamama dezavantajları vardır (9). Kompleman Birleşmesi Reaksiyonu (KBR), İndirekt Hemagglütinasyon Testi, Tetrazolyum Redüksiyon İnhibisyon Testi, Metabolik İnhibisyon Testi, Lateks Agglütinasyon Testi (LAT), Soğuk Agglütinasyon Testi (SAT), Enzyme Immunoassay (EIA), DNA prob teknikleri ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi tanı yöntemleri de kullanılarak tanıya yardımcı olunabilir (3,8,10-12).

Bu çalışmamızda; yakınmaları, fizik muayene, rutin laboratuvar ve radyolojik bulguları ile toplumdan kazanılmış pnömoni düşünülen hastalardan PBAL ile alınan materyallerden etkenin izole edilmesi ve bu olgularda ayrıca serolojik incelemeler yapılarak SAT ve EIA'nın tanısal değerlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Kasım 1995-Haziran 1996 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi (GATA) İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD klinik ve laboratuvarlarında yapıldı.

A. Olgu Seçimi

GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ABD ve Göğüs Hastalıkları ABD kliniklerinde akciğer infeksiyonu ön tanısı konularak yatırılan ve tetkik edilen, yaşları 18-36 (ortalama 26.7) arasında, 50'si (%83.3) erkek, 10'u (%16.7) bayan, toplam 60 hasta çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınma koşulları; hastalığının toplum kaynaklı olması, serolojik testleri etkileyecek herhangi bir kollajen doku hastalığı, malign hastalık veya bağışıklık sistem bozukluğu gibi bilinen bir hastalığının ve hastaneye başvurmada önce antibiyotik kullanma öyküsünün bulunmaması olarak belirlendi. Olguların yakınmaları, fizik muayene bulguları, akciğer grafilerinde saptanan patolojik görünüm ve laboratuvar bulgularından kan BK sayısı, ESH, periferik yayma sonuçları not edildi. Balgam verebilen olgularda direkt ve Gram boyaması ile balgam incelemesi yapıldı. Uygulanan PBAL yöntemi ile elde edilen bronkoalveolar sıvıların ekimleri ve Gram yöntemi ile boyaması yapıldı, mikroskopik inceleme değerlendirilerek sonuçları kaydedildi.

Hastaların tümünde PBAL uygulaması ile birlikte iki adet düz kan örneği alınarak aynı gün 2.000 devir/dakika hız ile 5 dakika santrifüje edildi ve serumları ayrıldı. Tüplerden birisi SAT araştırılmak için kullanıldı, diğeri ise EIA ile IgM cinsinden *M. pneumoniae* antikorları aranmak üzere -60°C'de derin dondurucuda saklandı.

B. Materyal

1. *M. pneumoniae* üretimi için, Pneumofast (International Mycoplasma Inc., Signes, France) kitleri kullanıldı. Pneumofast kitinin içeriği:

a) *M. pneumoniae* transport besiyeri: *Mycoplasma* broth base, Bacto peptone (Difco), Bacto tryptone (Difco), H₂O, NaOH.

b) *M. pneumoniae* supplement (Liyofilize): Glukoz, Taze yeast extract, CMRL-1066-Medium, At serumu, Fenol kırmızısı.

c) Bir adet 10 kuyucuktan oluşan Pneumofast plağı.

2. Diğeri mikroorganizmalar için aerob besiyeri olarak Eosine Metilen Blue (EMB) agar ve %5 koyun kanlı agar kullanıldı.

3. *M. pneumoniae* IgM antikorunun araştırması, SeroELISA Mp-IgM (Savyon Diagnostics LTD, Ashdod, Israel) kitleri kullanılarak yapıldı.

4. SAT: %0.2'lik eritrosit süspansiyonu kullanıldı.

C. Metod

1. Araştırma grubunu oluşturan olguların tümünde bronkoskopiden 15 dakika önce premedikasyon amacı ile 0.01 mg/kg atropin intramusküler olarak verildi, %1'lik prilokain solüsyonu nebulizatör inhalasyonu şeklinde 15-20 dakika süre ile uygulandı. Daha sonra bronkoskopi işlemine geçildi, akciğer grafisinde görülen infiltrasyon bölgesine ulaşıldığında ya da pürülen sekresyon görüldüğünde, PBAL kateteri ile üç steril tüpe materyal alındı. Hastalardan aynı gün iki tüp düz kan alındı. Materyaller 15 dakika içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. *M. pneumoniae* ve olası diğeri bakteriler için iki farklı ekim işlemi yapıldı.

a) *M. pneumoniae* için ekimler: Hastalardan alındıktan sonra %10'luk NaOH ile homojenize edilen PBAL sıvılarından her hasta için ayrı ayrı Pneumofast kuyucuklarına steril pipetlerle 100 µL miktarda konuldu ve kuyucukların üzeri parafin ile kaplanarak 37°C'da etüvde inkübe edildi. Ekimden 24 saat sonrasında itibaren 12 gün süre ile her gün üreme olup olmaması yönünden değerlendirildi. İnoküle edildiğinde kırmızı renkte olan kuyucukların, *M. pneumoniae*'nin glukozu fermente etmesi ve orta-

mın pH'sını düşürmesi sonucunda sarı renk aldıkları gözlemlendi.

Testin pozitiflik kriteri, inkübasyon esnasında 1 ve 2 nolu kuyucuğun renginin sarıya dönüşmesi idi. Sadece 1 nolu kuyucukta renk değişimi bulunması 10⁴ "Colour Changing Unit" (CCU)/mL, ikinci kuyucuğun da sarı olması ise 10⁵ CCU/mL pozitiflik olarak değerlendirildi. Antibiyotiklerin bulunduğu kuyucuklardaki sarı renk mikroorganizmanın o antibiyotiğe dirençli olduğunu; renk değişiminin bulunmaması yani kırmızı rengin sebat etmesi ise duyarlı olduğunu ifade etmekteydi.

b) Diğeri olası bakteriler için ekimler: Öncelikle PBAL örneklerinin 100'er katlık seri dilüsyonları (10¹, 10³, 10⁵) hazırlandı ve kantitatif kültürler için kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine ekimler yapıldı ve kültür plakları 18-24 saat süreyle 37°C'de etüvde inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda besiyerlerindeki üremeler değerlendirilerek üreyen bakteriler standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı.

2. Hasta serumunda *M. pneumoniae* IgM antikorları EIA yöntemiyle araştırıldı. Cut-off değerinden $\geq + \%10$ olan sonuçlar pozitif olarak değerlendirildi.

3. SAT ile serumda soğuk aglutininin aranması: 5 cc sıratlı kan ve 5 cc düz kan kullanılarak çalışıldı. Örnekler bir gece buzdolabında bekletildi ve ertesi gün 10 dakika oda ısısında bekletilip çalkalandı. Homojen şekilde dağılma varsa negatif, aglutine olmuşsa pozitif olarak değerlendirildi.

4. *M. pneumoniae*'nin tanısında kültür esas alınarak EIA ve SAT'ın özgülüğü ve duyarlılığı hesaplandı. Sonuçların yorumlanmasında X² testi ve Student-t testi kullanıldı.

BULGULAR

Araştırma süresince tüm parametreler göz önüne alınarak toplum kaynaklı pnömoni tanısı konan hasta sayısı 60 idi. Bunların dağılımı Tablo 1'de ve PBAL sıvılarında üretilen mikroorganizmaların dağılımı Tablo 2'de verilmiştir. *M. pneumoniae* üretilen olguların 9'u (%81.8) erkek, 2'si (18.2) kadındı. Bu olguların yaş ortalaması 22.4 (19-25) idi. Bu 11 olgunun 8'inden (%72.7) balgam örneği alınabildi.

M. pneumoniae üretilen olguların sadece 8'inde soğuk aglutininin düzeylerinin ölçülmesi için hastaneye başvuru günde ve 14 gün sonra olmak üzere iki kez serum örneği alınabildi. Diğeri 3 olgunun ise başvurdukları esnadaki serumları alınabildi. Olguların soğuk aglutininin düzeyleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Belirlediğimiz 11 *M. pneumoniae* pnömonisi olgusundan 6'sında (%54.5) SAT pozitif olarak bulundu. Bunlardan 5 tanesinde çift serum örneği alınmıştı ve ikinci örneklerde daha yüksek dilüsyonlarda pozitiflik belirlendi. Bir olguda ise tek serum örneğinde pozitiflik saptandı. Olgularımızdan 3'ünde çift serum

Tablo 1. Olguların Tanılara Göre Dağılımı.

Tanı	n
<i>M. pneumoniae</i> pnömonisi	11
Tipik pnömoni	45
Etkeni Belirlenemeyen	4

Tablo 2. PBAL Sıvısında Üretilen Mikroorganizmaların Dağılımı.

Üreyen Bakteri	n	%
<i>S. pneumoniae</i>	14	23.3
<i>M. pneumoniae</i>	11	18.3
<i>K. pneumoniae</i>	7	11.7
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	8.3
<i>Enterococcus</i> spp.	5	8.3
<i>Acinetobacter</i> spp.	4	6.7
<i>S. marcescens</i>	4	6.7
<i>M. catarrhalis</i>	3	5.0
Koagülaz (-) <i>Staphylococcus</i>	2	3.3
<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. aureus</i>	1	1.7
Etken üretilemeyen	4	6.7
Toplam	60	100

örneğinde değişiklik saptanmazken, 2 örnekte tek serumda negatiflik saptandı.

Tüm 60 olgu içerisinde *M. pneumoniae* pnömonisi olmadığı saptanan 4 (%6.66) olguda da çift serum örneğinde SAT pozitif olarak bulundu. Bunlardan birinde etken mikroorganizmalar olarak *S. aureus* + *P. aeruginosa* saptandı. İki hastada ise mikroorganizma üretilemezken, birinde *Acinetobacter* spp. izole edildi.

EIA sonuçları ile 11 *M. pneumoniae* pnömonisinin tamamı pozitif olarak bulundu. Sadece bir serum örneğinde kültür sonucu *K. pneumoniae* olduğu halde EIA pozitif olarak bulundu. Karşılaştırılan tanı testlerinden EIA ve SAT'ın özgüllüğü ve duyarlılığı Tablo 4 ve 5'de verilmiştir.

TARTIŞMA

M. pneumoniae, çocuklar ve genç erişkinlerde toplum kaynaklı pnömoniler içinde ve ayrıca atipik pnömoni etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan patojen bir mikroorganizmadır. *M. pneumoniae* pnömonisi, uygun tedavi ile ve hatta kendini sınırlayan bir hastalık olduğu için tedavi edilmese de iyileşme özelliğindedir. Atipik pnömoni etkenlerinden virüsler hariç tümünün tedavi protokolü hemen hemen aynı olduğu için, ilk planda ayırıcı tanıya gidilmesinin zorunlu olmadığı akla gelebilmektedir. Esasen bu genelleme çok hatalı da olmayabilir. Ancak, infeksiyonun seyrinde *M. pneumoniae*'ya karşı gelişen antikorlar, antijenik benzerlik gereği organizmada neredeyse tüm sistem hücrelerini antijen olarak algılamakta ve ekstrapulmoner komplikasyonların gelişimine yol açmaktadır (11,13-15). Sonuç olarak, az sayıda da olsa olgularda şimdilik bu mekanizma ile açıklanan ekstrapulmoner komplikasyonların görülmesi ve bazen de konak immünitesine bağlı olarak

Tablo 3. *M. pneumoniae* Üretilen Olguların Soğuk Aglutininin Düzeyleri.

Soğuk aglutinin profili	n (%)	Titre	
		1. Serum	2. Serum
Çift serum örneğinde serokonversiyon	1 (9.1)	1/32	1/64
	3 (27.3)	1/64	1/128
	1 (9.1)	1/64	1/256
Çift serum örneğinde değişme olmayan	3 (27.3)	1/16	1/16
Tek serum örneğinde pozitiflik	1 (9.1)	1/64	-
Tek serum örneğinde negatiflik	2 (18.2)	1/16	-
Toplam	11 (100)		

Tablo 4. *M. pneumoniae* Tanısında EIA Testinin Kültüre Göre Özgüllüğü ve Duyarlılığı.

	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
EIA Pozitif	11	1	12
EIA Negatif	-	48	48
Toplam	11	49	60

EIA'nın özgüllüğü: $48/49 \times 100 = \%97.96$ EIA'nın duyarlılığı: $11/11 \times 100 = \%100.00$

Tablo 5. *M. pneumoniae* Tanısında SAT'ın Kültüre Göre Özgüllüğü ve Duyarlılığı.

	Kültür Pozitif	Kültür Negatif	Toplam
SAT Pozitif	6	4	10
SAT Negatif	5	45	50
Toplam	11	49	60

SAT'ın özgüllüğü: $45/49 \times 100 = \%91.84$ SAT'ın duyarlılığı: $6/11 \times 100 = \%54.55$

infeksiyonun fulminant seyretmesi söz konusu olabilmektedir. Öte yandan, solunum sistemine ait belirti ve bulguların ekstrapulmoner bulgulara oranla arka planda kalabilmesi, tanıyı güçleştirmekte ve tedaviyi geciktirmektedir. Bu nedenlerle öncelikle *M. pneumoniae* olgularında erken tanıya varılması ve organizmaya, mikroorganizma antijenlerini tanıyabilecek yeterli zamanın tanınmaması açısından tedaviye olabildiğince erkenden başlanması, gelişebilecek bu komplikasyonların önlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Ek olarak, uygun antimikrobiyal tedaviye başlanmasına rağmen gelişecek bu komplikasyonlara karşı hazırlıklı olunması açısından da güvenilir, ucuz ve hızlı tanı yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir.

Araştırmamızda; 60 toplum kaynaklı pnömoni olgusu klinik belirtiler, rutin kan ve balgam tetkikleri, kültür, EIA, SAT ve radyolojik tetkikler kullanılarak irdelenmiş ve 11 olguda etkenin (%18.3) *M. pneumoniae* olduğu saptanmıştır. Diğer araştırmalarda olduğu gibi çalışmamızda da birinci sırada yer alan *S. pneumoniae*'nin ardından *M. pneumoniae*, ikinci sırada sorumlu etken olarak bulunmuştur. Bu sonuç, çalışmamızda materyalin toplandığı 8 ayın toplam sonuçlarını ifade etmektedir. Mevsimsel farklılıklar gözletilmeksizin bu değer, diğer çalışmalarda da benzer şekilde (%10-35 arasında) bulunmuştur (1-3).

Foy ve arkadaşları, alt solunum yolları enfeksiyonu olan çocuk yaş grubu ve erişkin grubundaki 622 olguda yaptığı çalışmada KBR kullanmış ve 320 pnömoni olgusundan 107'sinde (%33) *M. pneumoniae*'yi sorumlu etken olarak saptamıştır (16). Lehtomaki ve arkadaşları, askeri birliklerde görülen pnö-

moni etkenlerinin dağılımını göstermek için KBR kullanmışlar ve *M. pneumoniae* oranını %21.7 olarak belirlemişlerdir (5).

Bir başka çalışmada toplum kaynaklı pnömoni tanısı alan ve yoğun bakım ünitesinde tedavi görme endikasyonu olan 60 olguda etken serolojik olarak araştırılmış ve 4 olguda (%7) *M. pneumoniae* saptanmıştır (17). Çalışmamızda 1 olgu (%1.7) solunum fonksiyonlarının bozulması üzerine mekanik ventilatöre bağlanmış ve yoğun bakım gerektirmiştir. Bu sonuç, *M. pneumoniae* pnömonisinin bazı olgularda ağır seyredebileceğini göstermektedir.

Hastalıkların tanısında, en sık karşılaşılan klinik belirtilerin belirlenmesi kuşkusuz büyük önem taşımaktadır. *M. pneumoniae* pnömonili olgularımızda en sık karşılaşılan yakınmalar; yüksek ateş (%90.9), öksürük (%81.8), balgam çıkarma (%72.7) ve baş ağrısı (%72.7) olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda bu oranlar; ateş için %96-100, öksürük için %93-100, kırgınlık için %74-89 ve baş ağrısı için %60-84 bulunmuş olup, diğer pnömonilerde görülenlere ek olarak bu pnömonilerde baş ağrısının daha fazla sıklıkla semptomatolojide yer aldığı dikkati çekmektedir (18).

Pnömoni etkenlerinin saptanması amacı ile materyal alınmasında uygun yöntemi belirlemeye yönelik araştırmalarda invaziv bir yöntem olan TTA'nın başarısı merak edilen bir konudur. Bunu kapsamlı bir çalışma ile araştıran Barlett ve arkadaşları, 283 pnömonili olgunun 235'inde (%83) uygun materyal almayı ve etkeni üretmeyi başarmışlardır (19). TTA ile materyal alınması güvenli gibi görünmektedir. Ancak önemli olan, etkenin en kısa sürede tanımlanması

olduğuna göre, hangi tanısal prosedürün kullanılması halinde en kısa sürede ve doğru tanıya varılabileceği halen kesinleştirilmemiştir. TTA ve nazofaringeal sürüntünün kullanıldığı ve birçok yeni tekniğin denendiği araştırmalarda dahi tüm pnömoni olgularında kesin mikrobiyolojik tanıya varılma oranı %60-70'ler civarında bulunmuştur (20).

Alt solunum yollarından infekte materyalin alınmasında kullanılan ve invaziv bir yöntem olsa da TTA'ya göre daha özgül ve daha az kontaminasyon riski taşıyan iki bronkoskopik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar PSB ve PBAL olup, pnömoni tanısında geniş kullanım alanı bulmuşlardır. PSB ile yapılan 16 ayrı çalışmada özgüllük %69-100 (%92) ve duyarlılık %64-100 (%82) olarak belirlenmiştir (21-23). Kahn ve Jones, alt solunum yolları enfeksiyonu olan 18 olguya uyguladıkları PBAL ile %88.9 oranında uygun materyal alabildikleri ve etken izolasyonunu sağlamışlardır (6). Diğer bir araştırmada, Violan ve arkadaşları, PBAL yönteminin özgüllüğünü %100, duyarlılığını %76 olarak bulmuşlardır (24).

Araştırmamızda, bu teknikler içinde yer alması gerektiği düşünülen PBAL kullanılarak; kontaminasyonsuz ve daha kaliteli materyal edinilmesi planlanmıştır. Bu görüşümüz, araştırmamızda yer alan toplam 60 olgudan 56'sından (%93.3), diğer tanı testleri ile de doğrulandığı üzere, doğru materyal alındığının ve gerçek sorumlu bakterinin izole edildiğinin belirlenmesi ile doğrulanmıştır.

Klinik materyal olarak PBAL ile edinilen sıvının kullanıldığı *M. pneumoniae* izolasyonuna yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması ilginçtir. Bu nedenle, sonuçlarımızın karşılaştırılabilmesi mümkün olamamıştır. Bu bakımdan, PBAL ile materyal alınan çalışmamız, bu konudaki diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Oysa günümüzde, atipik etkenlerin düşünülmediği pnömoni olgularında PBAL ile materyal alınması oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, atipik pnömoni düşünülen olgularda da kaliteli materyal edinilmesi amacı ile PBAL tekniğinin kullanılmasının daha doğru bir yaklaşım olacağı, araştırmamız sonucunda önerilebilir bir bulgudur.

Alt solunum yolları enfeksiyonlarından sorumlu bakterilerin tanımlanması için klinikte en sık kullanılan yöntemler; balgamın mikroskop altında direkt incelenmesi, yaymasının Gram yöntemi ile boyanması ve kültür çalışmalarıdır. Balgamın incelenmesi, toplum kaynaklı pnömonili olguların %50'sinden azında doğru sonuç verebilmektedir. Çalışmamızda balgam yaymasının inceleme bulgularının *M. pne-*

umoniae pnömonisi tanısına katkıları da araştırılmıştır. Olgularımızın balgam yaymalarının x100 büyütmedeki incelemelerinde en sık bulgunun; her sahada 6-9 lökosit bulunması ve sahalarda mikst flora izlenimi veren bakterilerin görülmesidir. Ancak, *M. pneumoniae* pnömonili olgularımızda hiçbir yayma bulgusunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tanısal değere sahip olmadığı da belirlenmiştir (tümü için $p>0.1$). Balgam kültürü de ilk bakışta etkensele tanı için uygun bir materyal olarak düşünülebilir. Balgam, çıkarılması sırasında orofarinkste bulunan bakteriler ile kontamine olur ve gerçek pnömoni etkeninin izolasyonunu zorlaştırır, hatta olanaksızlaştırır. Barret-Conner ve arkadaşları, 51 *S. pneumoniae* pnömonili olgunun 23'ünde (%45) klasik mikrobiyolojik yöntemleri kullanarak balgamda etkeni üretebilmişlerdir (25). Bu bakımdan, balgamın, direkt veya gerekli boyama yöntemleri sonrasında incelenmesi güven vermeyen, ancak destekleyiciliği açısından yine de vazgeçilmemesi gereken bir tanı yöntemidir. Günümüzde balgam kültürünün *M. pneumoniae* pnömonisinde yeri olmadığı kabul gördüğünden, araştırmamızda bu teknik kullanılmamıştır.

M. pneumoniae enfeksiyonunun pnömoniler içindeki sıklığının belirlenmesi, olgulara kesin tanının konması ve taşıyıcılık oranlarının belirlenmesinde en güvenilir yöntem, kuşkusuz yukarıda sayılan invaziv teknikler ile direkt olarak enfeksiyon bölgesindeki materyalin alınması, klasik besiyerlerine ekilmesi, sorumlu etkenin üretilmesi ve identifiye edilmesidir. Ancak, etkenin *M. pneumoniae* için hazırlanmış bifazik besiyeri veya Edward-Hayflick besiyeri gibi özgül besiyerlerinde üretilmesi için gereken süre oldukça uzun olup, materyal ekilen besiyerlerinin 7-14 gün süre ile izlenmesini gerektirmektedir (26). Çoğunlukla değişmez bir kural olarak bakteriyel enfeksiyonların etkene yönelik tanısında kültür çalışmaları altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, kültür çalışmaları, gecikilmesi halinde immünopatolojik gelişimlere yol açabilen *M. pneumoniae* pnömonisi olgularında gerekli olan hızlı tanı için pratik olamamaktadır. Araştırmamızda, buna alternatif olabilecek güvenilirlikteki hızlı tanı yöntemlerinin varlığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Hemogram, sedimantasyon ve radyolojik incelemeler gibi özgül olmayan tetkiklerin tanıya oldukça sınırlı katkısı, araştırmacıları daha güvenilir, özgül ve duyarlı testlerin bulunmasına yöneltmiştir. Bunlardan birisi olan ve esasen sınırlı koşullarda tanısal değere sahip olan SAT, araştırmamızın da önemle üzerinde durulan bir parametresini oluşturmuştur. Olgularımı-

zın sadece 6'sında (%54.5) ilk hafta ölçümlerinde soğuk agglütinasyon pozitifliği belirlenmiştir. Bu testin özgüllüğü %91.84, duyarlılığı ise %54.55 olarak hesaplanmıştır. Cassell ve arkadaşlarının çalışmasında olguların %36-76'sında bu testin pozitif bulunduğu belirlenmiştir (1). Bu sonuçlar göz önüne alınırsa, diğer değerli tanı testleri kullanılmaksızın, tek başına SAT sadece bir destek bulgusu olarak kabul edilebilir. Ancak, değerli tanı testlerinin kullanılmadığı kısıtlı koşullarda SAT'ın önemli bir destekleyici test olabileceği de unutulmamalıdır.

M. pneumoniae'nin klasik yöntemlerle üretilmesinin hızlı tanıda sorun yarattığı bilinmektedir. Bu nedenle yine direkt olarak klinik materyalin kullanıldığı ve bakterilerin özgül mikrobiyolojik ve/veya biyosimik özelliklerinden yararlanılan hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerinin kazandırılması amacı ile birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında keşfedilen Pneumofast, bakterinin glikozu fermente etmesi sonucunda ortama salınan özgül metabolitlerinin ortam pH'sını düşürmesi sonucunda oluşan renk değişim reaksiyonu prensibi ile çalışmaktadır. Çalışma prosedürü 24-48 saatte tamamlandığı için de oldukça hızlı bir tanı sağlamaktadır. Lehtomaki ve arkadaşları, difazik besiyeri kullanarak yaptıkları bir çalışmada *M. pneumoniae*'nin inkübasyondan 6-14 gün (ortalama 10 gün) sonra ürediğini belirlemişlerdir (27). Çalışmamızda Pneumofast ile 9 olguda 24 saat sonra, 2 olguda ise 48 saat sonra üreme gözlenmiştir.

Serolojik testler, kültür ortamlarında üremelerin de güçlüklerle karşılaşılan bakteriyel, başka rutin tetkik olanağı kullanılamayan viral ve üretim prosedürleri zahmetli veya pahalı olan toksoplazmoz gibi paraziter infeksiyonların tanısında büyük önem taşımaktadır. *M. pneumoniae* infeksiyonları için de bu durum geçerlidir. Doğru, güvenilir ve hızlı tanı sağladıkça kullanılan yöntemin salt indirekt kriterlere bağlı olması bu gibi infeksiyon hastalıklarında gözardı edilebilir bir sakıncadır. *M. pneumoniae* infeksiyonunun tanısında kullandığımız güvenilirliği yüksek iki testten birisi olan EIA, hastalığın birinci haftasından itibaren alınan tek serum örneğinde etkene özgül IgM yapılı antikorların gösterilmesini sağlamakta ve kesin tanı için gereken toplam süre en çok 1.5 saat olduğu için çok hızlı bir tanı avantajı doğurmaktadır. Testin diğer önemli bir üstünlüğü, ikinci (konvalesan döneme ait) bir ölçüm gerektirmeksizin tanı sağlayabilmesidir. Araştırmamızda; tekniğin özgüllüğü %97.96 ve duyarlılığının %100 olduğu belirlenmiş, SAT'a göre daha duyarlı bir yöntem olduğu görül-

müştür. Kok ve arkadaşları, 17.326 olguluk bir seride EIA'nın özgüllüğünü %99, duyarlılığını %85 (28) ve Kleemola ve arkadaşları 51 olguluk seride bu değerleri sırası ile %100 ve %64 (29) olarak belirlemişlerdir. Maliyetleri dikkate alındığında, EIA'nın birim test maliyetinin, Pneumofast'inkine oranla dört kat daha ucuz olduğu saptanmıştır. Testin tek sakıncası, hastalığın hiperakut dönemi olan klinik belirtilerin başladığı ilk birkaç gün içinde tanıyı sağlayamamasıdır. Bu koşulda Pneumofast daha kullanışlı gibi görünse de *M. pneumoniae* pnömonisi olguları çok gürültülü bir başlangıç göstermediği için hastanın hekime başvurmasını gerektirecek tablonun oturmasına kadar geçen süre, EIA pozitifliği için yeterli olmaktadır.

Günümüzde çeşitli infeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan PCR, değişik klinik örneklerde *M. pneumoniae* varlığının gösterilmesi için gerekli bir çoğaltma yöntemi olarak da denenmiştir. Blackmore ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PCR'nin *M. pneumoniae* infeksiyonunda özgüllüğünü %92, duyarlılığını %98 olarak saptamışlardır (30). PCR ile kültür ve DNA prob testlerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada, doğru sonucun edinilebilmesi için gereken en az bakteri sayısının kültür için 10^3 , DNA prob testi için 10^4 - 10^5 iken, PCR için 1-10 olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, *M. pneumoniae*'nin tanısında PCR'nin hızlı ve seçkin bir yöntem olduğunu desteklemektedir (21,31).

Özet olarak araştırmamızdan şu sonuçlar çıkarılmıştır:

1. *M. pneumoniae* pnömonisi, tüm toplum kaynaklı pnömoni olgularının %18.3'ünü oluşturmakta ve sıklık olarak *S. pneumoniae*'den sonra ikinci sırayı almaktadır.

2. Hastalardan klinik materyal alınmasında PBAL tekniğinin kullanılması ile oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Alınan balgamın direkt veya uygun boyama teknikleri uygulandıktan sonraki incelemelerinin *M. pneumoniae* açısından önemli bir tanısal avantajının bulunmadığı belirlenmiştir. Atipik pnömonilerin ayırıcı tanısını sağlamasa da, olguların bakteriyel bir pnömoni olup olmadığının belirlenmesi amacı ile her olguda yapılması gerekmektedir.

3. *M. pneumoniae* infeksiyonunun tanısında kullanılan EIA, hastalığın birinci haftasından itibaren serumda etkene özgül IgM yapısındaki antikorları belirleyerek akut infeksiyonu oldukça doğru olarak gösterebilmektedir. Oldukça düşük maliyeti ve kısa süreli test prosedürü ile yaygın kullanıma uygundur. Özgüllüğü %97.96 ve duyarlılığı %100'dir. Özgüllük

ve duyarlılığı SAT'a göre anlamlı düzeyde yüksek (sırası ile $p<0.001$ ve $p<0.05$) bir yöntemdir. Bununla birlikte, kısıtlı koşullarda SAT'ın destekleyici bir test olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Cassell GH, Cole BC. Mycoplasmas as Agents of Human Disease. N Engl J M 1981;8:80-9.
2. Moskal MJ. Mycoplasmal Infections. Postgraduate Med 1987;2:105-9.
3. Murray HW, Masur H, Senterfit LB, et al. The Protean Manifestation of *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Adults. Am J Med 1975;58:229-42.
4. Willet HP. *Mycoplasma*. In: Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM (eds). Zinsser Microbiology. 20th edition, New Jersey: Prentice-Hall International Inc, 1992: 730-5.
5. Lehtomaki K. Leinonen M, Takala A, et al. Etiological Diagnosis of Pneumoniae in Military Conscripts by Combined use of Bacterial Culture and Serological Methods. Eur J Clin. Microbiol Infect Dis 1987;3:348-54.
6. Kahn FW, Jones JM. Diagnosing Bacterial Respiratory Infection by Bronchoalveolar Lavage. J Infect Dis 1987;155:862-9.
7. Parides GC, Bloom JW, Ampel NM, et al. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Immunocompromised Hosts. Diagn Microbiol Infect Dis 1988;9:55-7.
8. Clyde WA, Chanock RM, Tully JG. Mycoplasmas. In: Davis, BD, Dulbecco R, Eisen HN (eds). Microbiology. Philadelphia: Lippincott Company, 1990:707-16.
9. Jacobs E, Bennewitz A, Brecht W. Reaction Pattern of Human Anti-*Mycoplasma pneumoniae* Antibodies in Enzym-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting. J Clin Microbiol 1986;23:517-22.
10. Lind K. An Indirect Haemagglutination Test for Serum Antibodies Against *Mycoplasma pneumoniae* Using Formalinized Tanned Sheep Erythrocytes. Acha Path Microbiol Scandinav 1968;73:459-72.
11. Martin RE, Bates JH. Atypical Pneumoniae. Infect Dis Clin North Am 1991;5:585-601.
12. Kraybill WH, Crawford YE. A Selective Medium and Color Test for *Mycoplasma pneumoniae*. Proc Soc Exp Biol Med 1965;118:965-70.
13. Easterbrook PJ, Smyth EG. Post-infectious Encephalomyelitis Associated with *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* Infection. Postgrad Med 1992;68:124-8.
14. Dewez P, Nodirth K, De Silva L, et al. Fever and Spastic Quadriplegia Caused by *Mycoplasma pneumoniae*. Pediatr Infect Dis J 1992;11:129-30.
15. Mills RW, Schoolfield L. Acute Transverse Myelitis Associated with *Mycoplasma pneumoniae* Infection. A Case Report and Review of the Literature. Pediatr Infect Dis J 1992;11:228-31.
16. Foy HM, Kenny GE, Sefi R, et al. Second Attacks of Pneumoniae Due to *Mycoplasma pneumoniae*. J Infect Dis 1977;135:673-7.
17. The British Thoracic Society Research Committee and The Public Health Laboratory Service.: The Aetiology, Management and Outcome of Severe Community-Acquired Pneumonia on the Intensive Care Unit Respir Med 1992;86:7-13.
18. Clyde WA. Clinical Overview of Typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. Clin Infect Dis 1993;17:32-6.
19. Barlett JG. Invasive Diagnostic Techniques in Pulmonary Infections in Respiratory Infections. In: JE. Pennington (ed). Diagnosis and Management. Second Edition, New York: Raven Press, 1988.
20. Burman LA, Trollfors B, Andersson B, et al. Diagnosis of Pneumonia by Cultures, Bacterial and viral antigen detection Test and Serology with Special Reference to Antibodies Against Pneumococcal Antigens. J Infect Dis 1991;163:1087-93.
21. Broughton WA, Middleton RM, Kirkpatrick MB, et al. Bronchoscopic Protected Specimen Brush and Bronchoalveolar Lavage in the Diagnosis of Bacterial Pneumonia. Infect Dis Clin North Am 1991;5:437-52.
22. Pang JA, Cheng A, Chan HS, et al. The Bacteriology of Bronchiectasis in Hong Kong Investigated by Protected Catheter Brush and Bronchoalveolar Lavage. Am Rev Respir Dis 1989;139:14-7.
23. Wimberley NW, Bass JB, Boyd BW, et al. Use of a Bronchoscopic Protected Catheter Brush for the Diagnosis of Pulmonary Infections. Chest 1982;82:556-62.
24. Violan JS, De Castro FR, Luna JC: Comparative Efficacy of Bronchoalveolar Lavage and Telescoping Plugged Catheter in the Diagnosis of Pneumonia in Mechanically Ventilated Patients. Chest 1993;103:386-90.
25. Barret-Conner E. The non-value of Sputum Cultures in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. Am Rev Respir Dis 1971;103:845-8.
26. Lehtomaki K., Kleemola M, Tukianen P, et al. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from Bronchoalveolar Lavage Fluid. J Infect Dis 1987;155:1339-41.
27. Lehtomaki K. Leinonen M, Takala A, et al. Etiological Diagnosis of Pneumoniae in Military Conscripts by Combined use of Bacterial Culture and Serological Methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:348-54.
28. Kok TW, Marmion BP, Varkanis G, et al. Laboratory Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infection. Epidemiol Inf 1989;103:613-23.
29. Kleemola SRM, Raty R, Karjalainen JE, et al. Evaluation of an Antigen-Capture EIA for Rapid Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infection. Eur J Clin Infect Dis 1993;12:872-5.
30. Blackmore TK, Reznikov M, Gordon DL. Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection. Pathology 1995;27:177-81.
31. Falguera M, Nogues A, Ruiz GA, et al. Detection of by polymerase chain reaction in lung aspirates from patients with community acquired pneumonia. Chest 1996; 110:972-6.

Yazışma Adresi:

A. Bülent BEŞİRBELLİOĞLU
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
06018 Etlik-/ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 13.01.1997 Kabul Tarihi: 19.05.1997