

Toplum Kökenli Pnömonisi Olan Erişkin Hastalarda Konvansiyonel ve Multipleks PCR Yöntemleriyle Bakteriyel Etiyolojinin Araştırılması*

Investigation of Bacterial Etiology with Conventional and Multiplex PCR Methods in Adult Patients with Community-Acquired Pneumonia

Semra KURUTEPE¹, Talat ECEMİŞ¹, Aylin ÖZGEN², Can BİÇMEN³, Pınar ÇELİK⁴, Serir AKTOĞU ÖZKAN⁵, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Izmir, Turkey.

³ Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

³ Dr. Suat Seren Chest Diseases and Surgery, Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Izmir, Turkey.

⁴ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa.

⁴ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Manisa, Turkey.

⁵ Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, İzmir.

⁵ Dr. Suat Seren Chest Diseases and Surgery, Training and Research Hospital, Department of Chest Diseases, Izmir, Turkey.

* Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 02.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.08.2012

ÖZET

Toplum kökenli pnömoni (TKP), hayatı tehdit eden ciddi bir hastalık olup, gelişmiş tanı yöntemlerinde rağmen olguların %50'sinden fazlasında etiyolojik etken saptanamamaktadır. Etiyolojinin belirlenmesinde en sık kullanılan tanı yöntemleri kültür ve serolojik testlerdir. TKP olgularında erken ve doğru tedavinin mortaliteyi azaltması nedeniyle hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, TKP'li erişkin hastalarda konvansiyonel yöntemler ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu/reverse line blot hibridizasyon (M-PCR/RLBH) yöntemiyle bakteriyel etiyolojinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Kasım 2008-Kasım 2010 tarihleri arasında hastanemize başvuran ve klinik olarak TKP tanısı alan 128 olgu (94'ü erkek; yaş aralığı: 19-81 yıl, ortalama yaş: 58 yıl) dahil edilmiştir. Hastalardan alınan solunum yolu örnekleri (balgam ve/veya bronkoalveoler lavaj), M-PCR/RLBH (GenID®, Autoimmun Diagnostika

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Semra Kurutepe, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye. Tel (Phone): +90 236 233 1920/428, E-posta (E-mail): semrakurutepe@yahoo.com

GmbH, Almanya) yöntemiyle *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* ve *Legionella pneumophila*'ya ait nükleik asit varlığı yönünden araştırılmıştır. Örneklerin eş zamanlı olarak, %5 koyun kanlı, çikolata, *Haemophilus* izolasyon, BCYE (buffered charcoal yeast extract)-selektif agar ve EMB besiyerlerinde kültürü yapılmıştır. Hastaların serum örneklerinde *C.pneumoniae* IgM ve IgG antikorları, mikroimmüno Floresans yöntemiyle (Focus Diagnostic, ABD); *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*'ya özgül IgM ve IgG antikorları ise indirekt immüno Floresan antikor yöntemiyle (Euroimmun, Almanya) araştırılmıştır. Çalışmamızda, TKP'li 128 hastanın 59 (%46.1)'unda toplam 73 adet bakteriyolojik etken tanımlanmıştır. En sık saptanan mikroorganizma *S.pneumoniae* olmuş (n= 32, %25), bunu *H.influenzae* ve *M.pneumoniae* (n= 9, %7), gram-negatif basil-ler (n= 10, %7.8), *M.catarrhalis* (n= 6, %4.7), *C.pneumoniae* (n= 4, %3.2), *L.pneumophila* (n= 2, %1.6) ve *Staphylococcus aureus* (n= 1, %1.4) izlemiştir. Olguların 15 (%11.7)'inde atipik etkenler saptanmış; 14 (%10.9) hastada çok etkenli karışık enfeksiyon varlığı izlenmiştir. M-PCR/RLBH yöntemiyle araştırılan mikroorganizmalar (*S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*) olguların %41.4 (53/128)'ünde saptanırken, konvansiyonel yöntemlerle bu etkenler %23.4 (30/128) olguda tanımlanmış ve bu fark anlamlı bulunmuştur (p< 0.05). Sonuç olarak verilerimiz, M-PCR/RLBH yönteminin, TKP olgularında bakteriyel etiyojinin belirlenmesinde konvansiyonel yöntemlere katkı sağladığını göstermiş (saptama oranı %23.4'ten %41.4'e yükselmiştir); bölgemizde TKP olgularının başlangıç tedavisinin *S.pneumoniae*, *M.pneumoniae* ve *H.influenzae*'yı kapsayacak şekilde olması gerektiğini vurgulamıştır.

Anahtar sözcükler: Toplum kökenli pnömoni; etiyoloji; kültür; seroloji; polimeraz zincir reaksiyonu; multipleks PCR.

ABSTRACT

Community-acquired pneumonia (CAP) is still a serious life-threatening disease, in which the etiologic agent cannot be identified in more than 50% of patients despite advanced diagnostic methods. The most commonly used methods in the determination of CAP etiology are culture and serological tests. Since early and accurate therapy reduces the mortality in CAP cases, rapid and reliable diagnostic methods are needed. The aim of this study was to determine the bacterial etiology in adult patients with CAP by implementing multiplex polymerase chain reaction/reverse line blot hybridization (M-PCR/RLBH) assay combined with conventional methods. A total of 128 cases (94 were male; age range: 19-81 years, mean age: 58) who were admitted to our hospital and clinically diagnosed as CAP between November 2008 - November 2010, were included in the study. Respiratory samples (sputum and/or bronchoalveolar lavage) obtained from patients were searched by M-PCR/RLBH method (Gen ID[®], Autoimmun Diagnostika GmbH, Germany) in terms of the presence of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella pneumophila* nucleic acids. The samples were simultaneously inoculated onto 5% sheep blood agar, chocolate agar, haemophilus isolation agar, buffered charcoal yeast extract-selective agar and EMB agar media for cultivation. Serum samples obtained from the cases were tested for IgM and IgG antibodies against *C.pneumoniae* by microimmunofluorescence (Focus Diagnostic, USA) and against *L.pneumophila* and *M.pneumoniae* by indirect immunofluorescence (Euroimmun, Germany) methods. The bacterial etiology was identified in 59 (46.1%) of 128 patients with CAP and a total of 73 pathogens were detected. The leading organism was *S.pneumoniae* (n= 32, 25%), followed by *H.influenzae* and *M.pneumoniae* (n= 9, 7%), gram-negative bacilli (n= 10, 7.8%), *M.catarrhalis* (n= 6, 4.7%), *C.pneumoniae* (n= 4, 3.2%), *L.pneumophila* (n= 2, 1.6%) and *Staphylococcus aureus* (n= 1, 1.4%). Infection with atypical pathogens were detected in 15 (11.7%), and mixed infections in 14 (10.9%) patients. The detection rate of microorganisms (*S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*, *M.pneumoniae*) searched by M-PCR/RLBH method was 41.4% (53/128), while those microorganisms were detected in 23.4% (30/128) of the patients by conventional methods, representing a significant difference (p< 0.05). It was concluded that M-PCR/RLBH method supplemented the determination of bacterial etiology in CAP ca-

ses by increasing the rate of detection from 23.4% to 41.4%. The results indicated that empirical treatment of CAP should primarily include antibiotics against *S.pneumoniae*, *M.pneumoniae* and *H.influenzae* in our region.

Key words: Community-acquired pneumonia; etiology; culture; serology; polymerase chain reaction; multiplex PCR.

GİRİŞ

Günümüzde çok sayıda ve etkin antibiyotik kullanımına rağmen, toplum kökenli pnömoni (TKP) halen sık rastlanan, tedavi maliyeti yüksek ve %1-50 arasında değişen mortalite oranlarına sahip bir enfeksiyon hastalığıdır^{1,2}. TKP etkenleri içinde en sık saptanan patojenler *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* ve *Legionella pneumophila*'dır³. TKP etiolojisinin belirlenmesinde en sık kullanılan konvansiyonel tanı yöntemleri kültür ve serolojik testlerdir⁴. Kapsamlı tanı testlerine rağmen, TKP etiolojisi olguların %30-50'sinde tanımlanamamakta, bu mümkün olsa bile etkenin izolasyonu ve duyarlılık testlerinin yapılması zaman almaktadır^{5,6}. Pnömoni tedavisindeki gecikmenin morbidite ve mortaliteyi artırdığı bilinmekte ve ampirik tedavinin başarısı için de olası patojenlerin doğru tahmin edilmesi gerekmektedir^{7,8}. Bu nedenle hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda solunum sistemi enfeksiyon etkeni birçok bakteriyel ve viral patojenin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayalı nükleik asit saptama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler konvansiyonel tanı yöntemlerine göre daha duyarlı ve hızlı olup, ayrıca antibiyotik tedavisi altındaki olgularda etkenin tanımlanmasını sağlayabilmektedir^{9,10}. Multipleks PCR temelli *reverse line blot* hibridizasyon yöntemi, tek bir örnek içinde çok sayıda hedefin eş zamanlı saptanmasına olanak vermektedir¹¹. Bu yöntemde, aynı tüp içindeki multipleks PCR ürünleri, birden fazla özgün sıralı oligonükleotid probalar kullanılarak membran stripler üzerinde oluşan hibridizasyon paternlerine göre değerlendirilir¹¹. Bu çalışmada, TKP'li erişkin hastalarda bakteriyel etiolojinin konvansiyonel yöntemler ve multipleks PCR/*reverse line blot* hibridizasyon yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Çalışmaya, Kasım 2008-Kasım 2010 tarihleri arasında göğüs hastalıkları anabilim dalı ve göğüs hastalıkları bölümüne başvuran; 48 saatten uzun süren ateş (> 38°C), dispne, öksürük (produktif veya nonproduktif) ve akciğer grafisinde infiltrasyon saptanıp, pnömoni tanısı almış ≥ 18 yaş üstü 128 hasta dahil edildi. Çalışma için lokal etik kurul (Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, 196/2008) onayı ve hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı.

Hastalardan alınan balgam örneklerinin Gram boyalı mikroskopik incelemesinde (x10 büyütme) epitel hücre sayısının 10'dan az olması kaliteli balgam kriteri olarak kabul edil-

di¹². Çalışmaya alınan her solunum örneği ikiye ayrılarak, biri steril tüpe konulup daha sonra multipleks PCR/*reverse line blot* hibridizasyon (Reverse Hybridization Sequence-Specific Oligonucleotide Probes-SSOP) testi çalışılıncaya kadar -70°C'de saklandı. Ayrılan diğer örnek ise kültür için kullanıldı. Serolojik testler için hastalardan alınan 5 ml venöz kan örneği 3000-5000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve serumlar çalışılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Kültür

Hastalardan alınan solunum yolu örnekleri [balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL)] %5 koyun kanlı agar, çikolata agar, *Haemophilus* izolasyon, *Buffered Charcoal Yeast Extract*-seçici besiyeri (BCYE-polimiksin B, anisomisin ve vankomisin) ve *Eosin Methylene Blue* agar (EMB, BD Biosciences, ABD) besiyerlerine ekildi. Plaklar 35°C'de %5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat ve *L.pneumophila* için BCYE agarda beş gün inkübe edildi. Ayrıca, hastaneye yatışı yapılan olgulardan bir set kan kültürü alınıp otomatize kan kültür sisteminde (Bactec 9120; Becton Dickinson, ABD) yedi gün süreyle izlendi.

Inkübasyon sonunda şüpheli koloniler standart mikrobiyolojik yöntemler ve ticari tanımlama kiti (BBL Crystal; BD Biosciences, ABD) kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. BCYE-seçici agarda üreyen şüpheli kolonilerden Gram boyama yapıldı; ayrıca BCYE agar ve %5 koyun kanlı agara pasajları gerçekleştirildi. BCYE agarda üreme olup, kanlı agar pasajlarında üreme saptanmayan kolonileri tanımlamak için *L.pneumophila* serogrup-1 laktiks aglütinasyon (drySPOT; Oxoid, İngiltere) testi kullanıldı¹².

Kalite kontrol amacıyla *S.pneumoniae* ATCC 6305 ve *L.pneumophila* ATCC 33152 suşu kullanıldı.

Serolojik Tanı

Hastaların serum örneklerinde *C.pneumoniae* IgM ve IgG antikorları mikroimmünofloresans (MIF; Focus Diagnostic, ABD) yöntemiyle; *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae* IgM ve IgG antikorları ise indirekt immünofloresan antikor (IFA; Euroimmun, Almanya) yöntemiyle test prosedürlerine uygun olarak araştırıldı. Olguların çoğu kontrollerine geldikleri için, 4-6 hafta arayla alınan kan örneğinde IgG titresinde ≥ 4 kat artış saptanması, bu çalışmada kriter olarak kullanılmadı.

Multipleks PCR/Reverse Line Blot Hibridizasyon (M-PCR/RLBH)

Klinik örneklerden genomik DNA izolasyonu, RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit (Invitex GmbH; Almanya) DNA ekstraksiyon sistemi kullanılarak yapıldı. *S.pneumoniae*, *M.catarrhalis*, *H.influenzae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*'ya ait gen bölgelerini çoğaltmak için CAP-Bac-PN Mix (Gen ID[®]; Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) kiti üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandı.

M-PCR/RLBH yönteminde; amplifiye edilmiş ve biyotinle işaretli multipleks PCR ürünleri özgün sıralı (ardışık) oligonükleotid probalar kullanılarak (Gen ID[®]; Autoimmun Diagnostika GmbH, Almanya) ters hibridizasyon yöntemiyle hibridize edildi. Hibridizasyon iş-

lemine takiben ortama alkalin fosfatazla işaretlenmiş streptavidin eklendi. Kromojen ile inkübasyon sonrası, biotin-streptavidin birleşmesi sonucu stripler üzerinde oluşan bantlar karşılık gelen hibridizasyon paternlerine göre, görsel olarak değerlendirildi¹¹.

Etiyolojik Etken Tanı Kriterleri

TKP etkenlerinin tanısında, (a) kan kültüründen izolasyon; (b) balgam kültüründe bas-kın üreme ve/veya BAL kültüründe $> 10^4$ üreme; (c) akut klamidya enfeksiyonunun serolojik tanısı için özgül IgM titresinin $\geq 1/16$ ve/veya özgül IgG titresinin $\geq 1/512$ olması; (d) *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae* enfeksiyonunun serolojik tanısı için özgül IgM antikorlarının pozitif bulunması ve/veya özgül IgG antikor titrelerinin $\geq 1/256$ olması kriter olarak kabul edildi^{12,13}.

İstatistiksel Analiz

Veriler, SPSS for Windows 11.5 (SPSS Inc, IL, USA) istatistik paket programında Fisher'in ki-kare testiyle değerlendirildi; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya, 94 (%73.4)'ü erkek, 34 (%26.6)'ü kadın ve yaş ortalaması 58 yıl (yaş aralığı: 19-81) olan 128 TKP olgusu alınmıştır. Konvansiyonel ve/veya moleküler yöntemlerle olguların 69 (%53.9)'unda bakteriyel etken saptanmamış; buna karşın 59 (%46.1) hastada en az bir bakteriyel etken tanımlanmıştır. Olguların 45 (%35.2)'inin bir etken, 14 (%10.9)'ünün ise iki etken ile enfekte olduğu saptanmış; 59 hastada toplam 73 bakteriyel etken belirlenmiştir.

En sık tanımlanan etken *S.pneumoniae* ($n = 32$, %25) olup, bu bakteri olguların 21 (%16.4)'inde tek; 11 (%8.6)'inde ise karışık enfeksiyon etkenlerinden biri olarak bulunmuştur. Pnömonokları sırasıyla; *H.influenzae* ve *M.pneumoniae* ($n = 9$, %7), gram-negatif basiller ($n = 10$, %7.8), *M.catarrhalis* ($n = 6$, %4.7), *C.pneumoniae* ($n = 4$, %3.2), *L.pneumophila* ($n = 2$, %1.6) ve *Staphylococcus aureus* ($n = 1$, %1.4) izlemiştir (Tablo I). Gram-negatif basillerin altısı *Pseudomonas aeruginosa*, ikisi *Acinetobacter baumannii* ve birer izolat da *Escherichia coli* ve *Serratia marcescens* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamızda, hastaların 88'inden kan kültürü alınmış ve bunların 3 (%3.4)'ünde sırasıyla *S.pneumoniae*, *E.coli* ve *P.aeruginosa* üremesi saptanmıştır.

Çalışmada tanımlanan bakteriyel etkenlerin kullanılan yöntemlere göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir. Buna göre kültürden en sık izole edilen mikroorganizma *S.pneumoniae* (%8.6) olmuş, bunu gram-negatif basiller (%7.8) izlemiştir. Atipik pnömoni etkenlerinin (*M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*) çoğunlukla serolojik testler ile tanımlandığı dikkati çekmiştir (Tablo II). *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*'nin toplam saptanma oranı konvansiyonel yöntemlerle %23.4 (30/128), moleküler yöntemle %41.4 (53/128) olarak belirlenmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tüm etkenlerin toplam saptanma oranları ise konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle sırasıyla %32 (41/128) ve %41.4 (53/128) olarak izlenmiştir (Tablo II).

Tablo I. Toplum Kökenli Pnömonisi Olan Olgularda Saptanan Bakteriyel Etkenlerin Dağılımı

Etken(ler)	Sayı (%)*
<i>S.pneumoniae</i>	21 (16.4)
<i>H.influenzae</i>	2 (1.6)
<i>M.catarrhalis</i>	2 (1.6)
<i>L.pneumophila</i>	2 (1.6)
<i>M.pneumoniae</i>	6 (4.6)
<i>C.pneumoniae</i>	3 (2.3)
Gram-negatif basil**	8 (6.2)
<i>S. aureus</i>	1 (0.8)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>H.influenzae</i>	5 (3.9)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.catarrhalis</i>	4 (3.1)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>M.pneumoniae</i>	1 (0.8)
<i>S.pneumoniae</i> + <i>C.pneumoniae</i>	1 (0.8)
<i>H.influenzae</i> + <i>M.pneumoniae</i>	1 (0.8)
<i>H.influenzae</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1 (0.8)
<i>M.pneumoniae</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1 (0.8)
Toplam	59 (46.1)

* Yüzde oranları toplam hasta sayısı (n= 128) üzerinden hesaplanmıştır.
** *P.aeruginosa* 6, *A.baumannii* 2, *E.coli* 1, *S.marcescens* 1 izolattır.

Tablo II. Etkenlerin Tanımlandıkları Yöntemlerine Göre Dağılımı

Tanımlanan etken (n)	Konvansiyonel yöntemler		Moleküler yöntem
	Kültür, n (%)*	Seroloji, n (%)*	M-PCR/RLBH, n (%)*
<i>S.pneumoniae</i> (32)	11 (8.6)	Y	31 (24.2)
<i>H.influenzae</i> (9)	3 (2.3)	Y	9 (7)
<i>M.catarrhalis</i> (6)	1 (0.8)	Y	6 (4.7)
<i>L.pneumophila</i> (2)	0	2 (1.6)	1 (0.8)
<i>M.pneumoniae</i> (9)	Y	9 (7)	4 (3.1)
<i>C.pneumoniae</i> (4)	Y	4 (3.1)	2 (1.6)
Gram-negatif basil (10)	10 (7.8)	Y	Y
<i>S.aureus</i> (1)	1 (0.8)	Y	Y
Toplam (62)**	30 (23.4)	30 (23.4)	53 (41.4)
Toplam (73)***	41 (32)	41 (32)	53 (41.4)

* Yüzde oranları toplam hasta sayısı (n= 128) üzerinden hesaplanmıştır;
** *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*'nin toplam saptanma oranları;
*** Tüm etkenlerin toplam saptanma oranları.
M-PCR/RLBH: Multipleks PCR/Reverse line blot hibridizasyon; Y: Çalışılmadı.

TARTIŞMA

Toplum kökenli pnömoniler, geniş ve etkin antibiyotik kullanımına rağmen özellikle ileri yaş grubunda ve ek kronik hastalığı olanlarda yüksek morbidite ve mortaliteyle seyretmektedir. Bu olgularda, tanı sonrası 4-8 saat içinde doğru tedaviye başlanması mortaliteyi azalttığından, hızlı tanı yöntemlerinin önemi artmaktadır¹⁴. Bu çalışmada, TKP olgularında bakteriyel etkenlerin hızlı ve doğru olarak belirlenmesi ve bu amaçla kullanılan M-PCR'nin katkısının değerlendirilmesi planlanmıştır.

Ülkemizde, TKP'lerde etkenin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, araştırılan etken profiline (bakteriyel ve/veya viral) ve kullanılan yöntemlere bağlı olarak %21-63 olguda etkenin saptanabildiği rapor edilmiştir^{14,15}. Atipik etkenlerin dahil olduğu bakteriyel etiolojinin kültür ve serolojik yöntemlerle araştırıldığı çalışmalarda ise TKP olgularının %21-45'inde etken belirlenmiştir^{14,15}. Ülkemizden bildirilen en yüksek oran, Köksal ve arkadaşlarının¹⁶ yaptıkları çok merkezli bir çalışmada elde edilmiş ve viral etkenlerin de araştırılmasıyla olguların %63'ünde etiyojik tanıya ulaşılabilmektedir. Diğer ülkelerden bildirilen çalışma sonuçlarına göre ise, yine araştırılan etken profili ve yöntemle bağlı olarak etiyojik tanı oranları %33-88 arasında değişmektedir¹⁷⁻¹⁹. Bu veriler, araştırılan etken profili ve buna bağlı yöntem çeşitliliği arttıkça, etken saptama oranlarının da arttığını vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızda, 128 TKP olgusunun 59 (%46.1)'unda atipik etkenler de dahil olmak üzere bakteriyolojik etken tanımlanmıştır. Hastalarımızda en sık saptanan TKP etkeni *S.pneumoniae* (%25) olmuştur. Ülkemizden ve yurt dışından bildirilen sonuçlarda bu oranın %13-48 arasında değiştiği görülmektedir^{14,20-23}. *S.pneumoniae*'yi çoğunlukla *H.influenzae* veya atipik etkenler (*M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila*) izlemekte olup, sıklık dağılımı ülkelere göre değişkenlik göstermektedir^{14,20}.

Atipik etkenlerin tanısında kullanılan kültür ve serolojik yöntemlerin rutin uygulanmasındaki güçlükler nedeniyle, ülkemizde bu etkenlere yönelik veriler sınırlıdır. Bu çalışmada TKP olgularının %11.7 (15/128)'inde atipik etkenler saptanmış olup, ülkemizden bildirilen diğer üç sonuçtan (%15, %20, %26) daha düşüktür^{16,24,25}. Bu durumun, hastalardan konvalesan döneme ait serum örneklerinin alınamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Farklı ülkelerden ise TKP olgularında atipik etkenler %11-66 arasında değişen geniş bir aralıkta bildirilmiştir²⁶⁻²⁸. Bu sonuçların değişkenliğinin, coğrafi bölge farklılıkları kadar kullanılan yöntem farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda, atipik etkenlerin serolojik yöntemlerle tanı oranı %11.7 iken, bu oran M-PCR ile %5.5 olarak izlenmiştir (Tablo II). Olgularımızda en sık saptanan atipik etken *M.pneumoniae* (%7) olmuştur.

Çalışmamızda, TKP'li olguların %10.9'unda birden fazla etken (karışık enfeksiyon) saptanmış olup, daha önce ülkemizden bildirilen sonuca benzer bulunmuştur¹⁶. Diğer patojenlere en sık eşlik eden etken *S.pneumoniae* olup, 14 olgunun 11'inde koenfeksiyon etkeni olarak izlenmiştir (Tablo I).

Gram-negatif basiller, TKP olgularında daha az sıklıkta saptanmakla birlikte, Asya ülkelerini içeren bir çalışmada en sık ikinci etken olarak %15 oranında bildirilmiştir²³. Bizim çalışmamızda gram-negatif basiller olguların %7.8'inde tanımlanmıştır.

Moleküler yöntem (M-PCR/RLBH) ile araştırılan *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *C.pneumoniae*, *L.pneumophila* ve *M.pneumoniae*, olguların %41.4 (53/128)'ünde saptanırken, konvansiyonel yöntemlerle bu etkenler %23.4 (30/128) olguda tanımlanmıştır ($p < 0.05$). Templeton ve arkadaşları⁹, TKP olgularında mikrobiyal etiyojolojiyi (bakteriyel ve viral) konvansiyonel yöntemlerle %49.5, gerçek zamanlı PCR ile %76 oranında saptadıklarını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada da, konvansiyonel olarak tanımlanan etken oranı %39 iken, M-PCR yöntemiyle %65'e ulaşmıştır²⁹. Johansson ve arkadaşları³⁰ ise bu oranları sırasıyla %60 ve %67 olarak bulmuşlar; konvansiyonel ve moleküler yöntemler arasında etken tespiti açısından anlamlı bir fark saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda kullanılan M-PCR/RLBH yöntemi, konvansiyonel tanı yöntemlerine katkı sağlayarak, TKP olgularında bakteriyel etiyojinin belirlenmesinde önemli artış (%23.4'ten %41.4'e) sağlamıştır. Ancak maliyetin yüksek olması nedeniyle, öncelikli olarak klinik tablonun pnömoni ile uyumlu olduğu hastalar için kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Ayrıca çalışmamızın verileri, bölgemizde tanı konulan TKP olgularının başlangıç tedavisinin *S.pneumoniae*, *M.pneumoniae* ve *H.influenzae*'yi kapsamı gerektiğini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Restrepo MI, Anzueto A. Severe community-acquired pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(3): 503-20.
2. Loke YK, Kwok CS, Niruban A, Myint PK. Value of severity scales in predicting mortality from community-acquired pneumonia: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2010; 65(10): 884-90.
3. Özlü T, Bülbül Y, Alataş F ve ark. Türk Toraks Derneği Erişkinlerde Toplumda Gelişen Pnömoni Tanı ve Tedavi Uzlaşısı Raporu. *Türk Toraks Dergisi* 2009; 10(Ek 9): 1-16.
4. Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3115-20.
5. Skerrett SJ. Diagnostic testing to establish a microbial cause is helpful in the management of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Infect* 1997; 12(4): 308-21.
6. File TM. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003; 362(9400): 1991-2001.
7. Meehan TP, Fine MJ, Krumholz HM, et al. Quality of care, process, and outcomes in elderly patients with pneumonia. *JAMA* 1997; 278(3): 2080-4.
8. Metlay JP, Fine MJ. Testing strategies in the initial management of patients with community-acquired pneumonia. *Ann Intern Med* 2003; 138(2): 109-18.
9. Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden WC, Graffelman AW, van den Broek PJ, Claas EC. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005; 41(1): 345-51.
10. Stralin K, Törnqvist E, Kaltoft MS, Olce'n P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 643-5.
11. Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2668-80.
12. Thomson RB Jr, Miller M. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology, pp: 286-330. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
13. Plouffe JF. Importance of atypical pathogens of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2): 35-9.

14. Özlü T, Bülbül Y, Ozsu S. Ulusal verilerle toplum kökenli pnömoniler. *Tuberk Toraks* 2007; 55(2): 191-212.
15. Gönllüör U, Akkurt İ, Bakıcı MZ, Sümer H. Sivas'ta toplum kökenli pnömonilerde bakteriyel etioloji. *Akciğer Arşivi* 2001; 2(4): 143-8.
16. Köksal İ, Özlü T, Bayraktar O, et al. Etiological agents of community-acquired pneumonia in adult patients in Turkey; a multicentric, cross-sectional study. *Tuberk Toraks* 2010; 58(2): 119-27.
17. File TM Jr, Tan JS. Incidence, etiologic pathogens, and diagnostic testing of community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 1997; 3(2): 89-97.
18. Saito A, Kohno S, Matsushima T, et al. Prospective multicenter study of the causative organisms of community-acquired pneumonia in adults in Japan. *J Infect Chemother* 2006; 12(2): 63-9.
19. Cilloniz C, Ewig S, Polverino E, et al. Community-acquired pneumonia in outpatients: aetiology and outcomes. *Eur Respir J* 2012; 40(4): 931-8.
20. Vergis EN, Yu VL. New directions for future studies of community-acquired pneumonia: optimizing impact on patient care. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18(12): 847-51.
21. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, et al. Microbial etiology of community-acquired pneumonia in the adult population of 4 municipalities in eastern Finland. *Clin Infect Dis* 2001; 32(8): 1141-54.
22. Lim WS, Macfarlane JT, Boswell TC, et al. Study of community acquired pneumonia aetiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. *Thorax* 2001; 56(4): 296-301.
23. Song JH, Oh WS, Kang CI, et al; Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens Study Group. Epidemiology and clinical outcomes of community-acquired pneumonia in adult patients in Asian countries: a prospective study by the Asian network for surveillance of resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(2): 107-14.
24. Saltoğlu N, Taşova Y, Yılmaz G ve ark. Toplumda edinilmiş pnömoni: Etiyoloji, prognoz ve tedavi. *FLORA* 1999; 4(4): 245-52.
25. Özlü T, Bülbül Y, Kaygusuz S, Öztuna F, Yıldırım Z, Köksal İ. Toplum kökenli pnömoni olgularımızda *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae* ve *L.pneumophila* sıklığı. *Solunum Hastalıkları* 2000; 11(2): 135-9.
26. Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, et al. Multiple pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia: a one-year prospective study of 346 consecutive patients. *Thorax* 1996; 51(2): 179-84.
27. Ishida T, Hashimoto T, Arita M, Ito I, Osawa M. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. *Chest* 1998; 114(6): 1588-93.
28. 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.
29. 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. *Trop Biomed* 2011; 28(3): 531-44.
30. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 2010; 50(2): 202-9.