

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TOPLUM KÖKENLİ PNÖMONİLERDEN SOYUTLANAN
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE SUŞLARININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE TANISI

DOKTORA TEZİ
Dr. M. Esra KOÇOĞLU

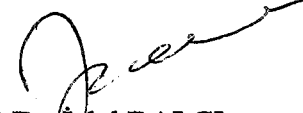
Şubat 2005

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nün Onayı

Prof. Dr. Erdem GÜMÜŞBURUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü




Bu tez çalışmasının bir 'Doktora' derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. İclal BALCI
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez, tarafımdan okunmuş ve her yönü ile bir 'Doktora' tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.



Yrd. Doç. Dr. Ayşen BAYRAM
Danışman

Tez Jürisi

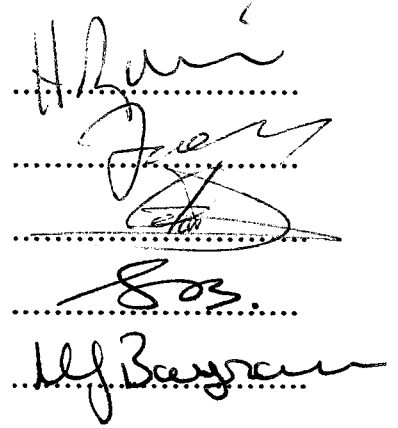
Prof. Dr. Hatice ÖZENCİ

Prof. Dr. İclal BALCI

Yrd. Doç. Dr. Tekin KARSLIGİL

Yrd. Doç. Dr. Ayşen BAYRAM

Yrd. Doç. Dr. Nazan BAYRAM



.....
.....
.....
.....
.....

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLULARIN LİSTESİ	iv
RESİMLERİN LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Streptococcus pneumoniae	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Morfoloji ve Boyanma	3
2.1.3. Kültür Özellikleri	3
2.1.4. Antijen yapısı	5
2.1.5. Patojenite	7
2.1.6. Yaptığı Hastalıklar	10
2.1.6.1. Streptococcus pneumoniae Pnömonisi	10
2.1.7 Laboratuvar Tanısı	12
2.1.8. Tedavi	14
2.1.9. Epidemiyoloji	17

2.1.10. Korunma ve Kontrol	17
2.2. Toplum Kökenli Pnömoniler	19
2.2.1. Patogenez	21
2.2.2. Komplikasyonlar	25
2.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 'nin Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	25
2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri	28
2.3.3. Real-Time PCR	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Klasik Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri	33
3.1.1. Mikroskopik İnceleme:	33
3.1.2. Kültür	34
3.1.3. Optokin Duyarlılık Deneyi	34
3.1.4. Safra Tuzunda Koloni Eritme Deneyi	34
3.2. Moleküler Tanı Yöntemleri	35
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	35
3.2.1.1. Proteinaz K-Fenol Yöntemi	35
3.2.1.2. Spin Filtre Yöntemi	35
3.2.2. Konvansiyonel PCR	36
3.2.2.1. Çoğaltma (Amplifikasyon) İşlemi	36
3.2.2.2. PCR Ürünlerinin İncelenmesi	37
3.2.2.3. Konvansiyonel PCR'da Kullanılan Reaktifler	40
3.2.3. Real-Time PCR	41

4.BULGULAR	44
5.TARTIŞMA	50
6.SONUÇLAR	55
7.KAYNAKLAR	56
8.ÖZGEÇMİŞ	66



TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 'nin Amerikan ve Danimarka serotiplendirim örneği	6
Tablo 2.2. Pnömonokokkal oluşumların virulans özellikleri	8
Tablo 2.3. Penisiline duyarlılıklarına göre <i>S. pneumoniae</i> pnömonilerinin kesin tedavisi	16
Tablo 2.4. Akut pnömonide etyolojik ajanlar	20
Tablo 2.5. Solunum Yolu Hastalıklarında Organizma Savunma Mekanizmaları	21
Tablo 4.1. Örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı	44
Tablo 4.2. Hasta örneklerinin kültür sonuçlarına göre dağılımı	45
Tablo 4.3. Kültür pozitif örneklerin optokine duyarlılık sonuçlarına göre dağılımı.	45
Tablo 4.4. Kültür pozitif örneklerin safrada erime deneyi sonuçlarına göre dağılımı	46
Tablo 4.5. Kültür pozitif suşların optokine duyarlılık ve safrada erime deneyi sonuçlarına göre dağılımı.	46
Tablo 4.6. Kültür pozitif örneklerin konvansiyonel PCR sonuçlarına göre dağılımı.	47
Tablo 4.7. Kültür pozitif örneklerin real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı.	47
Tablo 4.8. Kültür pozitif suşların konvansiyonel PCR ve real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı.	48
Tablo 4.9. Kültür pozitif suşların klasik yöntemler ve real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı	48

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 2.1. PCR'daki Aşamalar	27
Resim 3.1. Moleküler ağırlık markörünün agaroz jeldeki görüntüsü	38
Resim 3.2 (a). Kültür pozitif hasta örneklerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	39
Resim 3.2. (b) Kültür pozitif hasta örneklerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	39
Resim 3.3. Kültür pozitif <i>S. pneumoniae</i> suşlarının real-time PCR 'daki a amplifikasyon eğrileri.	43

KISALTMALAR

- BAL: Bronkoalveolar lavaj
BOS: Beyin omurilik sıvısı
C3: Kompleman 3
CIE: Karşıt immünelektroforez
CO₂: Karbondioksit
CRP: C reaktif protein
C_T: Döngü eşik değeri
dATP: Deoksiadenozintrifosfat
dCTP: Deoksisitozintrifosfat
dGTP: Deoksiguanozintrifosfat
DM: Diabetes mellitüs
DNA: Deoksiribonükleik asit
dNTP: Deoksinükleozintrifosfat
dUTP: Deoksiurasiltrifosfat
EDTA: Etilendiamintetraasetat
EMB: Eozin metilen mavisi
FAM: 6-Karboksifloresein
FRET: Floresans rezonans enerj transferi
g: Gram
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HPLC: Yüksek performanslı likit kromatografisi
IgA: İmmünglobulin A
IgG: İmmünglobulin G
IgM: İmmünglobulin M
iv: İntravenöz
kg: Kilogram
KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

lyt A: Otolizin geni
mg: Miligram
MIK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mM: Milimol
ng: Nanogram
PBP: Protein bağlayan protein
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
ply: Pnömolizin geni
pM: Pikomol
Psa A: pnömokokkal yüzey adhesini A
Psp A: pnömokokkal yüzey proteini A
RNA: Ribonükleik asit
SDS: Sodyumdodesilsülfat
SSC: Sodyum klorür-sodyum sitrat
SSS: Spesifik soluble substance
TAMRA: 6-Karboksitetrametilrodamin
TBE: Tris-borat EDTA
TKP: Toplum kökenli pnömoni
Tm: Erime ısısı
TNF: Tümör nekroz faktörü
U: Ünite
UV: Ultraviole
µg: Mikrogram
µm: Mikrometre

TEŞEKKÜR

Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr . İclal Balcı'ya teőekkürlerimi arz ederim. Eğitim sürem boyunca bilgi, görüş ve eleştirileri ile bana yol gösteren hocam Sayın Yrd. Doç Dr. Tekin Karslıgil'e teőekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında sürekli olarak desteğini yanımda hissettiğim, büyük bir özveriyle bu tezi tamamlamamda emeği geçen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşen Bayram'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel analizinde bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Servet Özgür'e teőekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarım sırasında materyal toplamamda bana yardımcı olan tüm meslektaşlarıma ve yardımcı sağlık personeline özellikle teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca her zaman desteğini hissettiğim eşime ve doktora telaşını benimle yaşayan çocuklarım Etkâ ve Utku'ya da gönülden teşekkür ederim.

Dr. Esra KOÇOğLU

ÖZET

Streptococcus pneumoniae toplum kökenli pnömoni etyolojisinde ilk sırada yer almakta olup, aşı ve antimikrobiyal tedaviye rağmen mortalite ve morbiditenin önemli bir sebebi olmaya devam etmektedir. Toplum kökenli pnömoni halen sık rastlanan, tedavi maliyeti yüksek ve ölümcül bir infeksiyon hastalığıdır. Günümüzde ileri tanı olanaklarına karşın, toplum kökenli pnömonilerin yarısından çoğunda etken mikroorganizma saptanamamaktadır.

Pnömonokların tanısında geleneksel olarak kültür, optokine duyarlılık testi, safrada erime deneyi ve serolojik testler kullanılmaktadır. Son yıllarda etkenin tanımlanmasında nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu temeline dayanan moleküler tanı yöntemlerinden de yararlanılmaktadır. Konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) yanında, örnekte bulunan DNA/RNA miktarını kantitatif olarak gösteren bir yöntem olan real-time PCR da *S. pneumoniae*'nin identifikasyonunda kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada, toplum kökenli pnömoni hastalarına ait alt solunum yolu örneklerinden soyutlanıp, klasik tanı yöntemleri ile *S. pneumoniae* olduğu düşünülen klinik izolatların konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri ile tanımlanması ve bu yöntemlerin duyarlılık ve seçicilik yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, Ocak 2004-Ocak 2005 tarihleri arasında alt solunum yolları infeksiyonu öntanısı alan erişkin hastalara ait balgam, trakeal aspirasyon sıvısı, bronş aspirasyon sıvısı ve plevral sıvı örnekleri değerlendirildi. Gram boyamada *S. pneumoniae*'nin tipik görünümüne sahip olan örnekler, %5 koyun kanlı agara ekilerek kültürleri yapıldı. Kanlı besiyerinde alfa hemoliz oluşturan kolonilere optokin duyarlılık deneyi ve safrada erime deneyi yapıldı. Klasik tanı yöntemleriyle pnömokok olduğu düşünülen suşlar konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri ile çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

Çalışmamızda 180 adet alt solunum yolu örneği incelendi; örneklerin 139'u (% 77.2) balgam, 16'sı (% 8.9) bronşiyal aspirasyon sıvısı, 16'sı (% 8.9) trakeal aspirasyon sıvısı ve 9'u (% 5) plevra sıvısı idi. Örnek alınan hastaların % 46.6'sı

erkek, % 53.3'ü kadın idi. Balgam örneklerinin 91'i (% 65.5), bronşiyal aspirasyon sıvısı örneklerinin 3'ü (% 18.7), trakeal aspirasyon sıvısı örneklerinin 6'sı (% 37.5), plevra sıvısı örneklerinin 4'ü (% 44.5) alfa hemolitik olup, pnömokokların tipik koloni morfolojisini gösterir nitelikteydi. Bu örnekler kültür pozitif olarak kabul edilerek, bunlara optokine duyarlılık ve safrada erime testleri yapıldı. Optokin testi yapılan toplam 104 kültür pozitif izolataın 65'i (% 62.5) optokine duyarlı, 12'si (% 11.5) optokine düşük derecede duyarlı, 27'si (% 26) optokine dirençli olarak bulundu. Safrada erime deneyinde 104 suşun 73'ünde (% 70.2) test sonucu pozitif bulunurken, 31 (% 29.8) suşta negatif bulundu. Optokine duyarlı bulunan 65 suşun tamamında safrada erime deneyi pozitif. Optokine düşük derecede duyarlı olan 12 izolataın 8'inde (% 66.7) safrada erime deneyi pozitif bulunurken, 4'ünde (% 33.3) negatif olarak bulundu. Optokine dirençli olan 27 izolataın tamamında safrada erime deneyi negatifti.

Kültür pozitif suşların moleküler yöntemlerle tanısında konvansiyonel PCR'da kültür pozitif balgam örneklerinin 55'i (% 60.4) pozitif, 36'sı (% 39.6) negatif, plevra sıvısı örneklerinin 3'ü (% 75) pozitif, 1'i (% 25) negatif bulundu. Bronşiyal aspirasyon sıvısı ve trakeal aspirasyon sıvısı örneklerinin tamamı konvansiyonel PCR'la pozitif bulundu. Real-time PCR'da balgam örneklerinin 61'i (% 67) pozitif, 30'u (% 33) negatif, plevra sıvısı örneklerinin 3'ü (% 75) pozitif, 1'i (% 25) negatif bulundu. Bronşiyal aspirasyon sıvısı ve trakeal aspirasyon sıvısı örneklerinin tamamı real-time PCR'la pozitif bulundu. Kültür pozitif 104 suşun 67'si (% 64.4) hem konvansiyonel PCR'da hem de real-time PCR'da pozitif bulunurken, 31 (% 29.8) suş her iki yöntemle de negatif bulundu. Altı (% 5.8) suş konvansiyonel PCR ile negatif, real-time PCR ile pozitif bulundu.

Sonuç olarak; *S. pneumoniae*'nin tanımlanmasında konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemlerinin en az diğer klasik tanı yöntemleri (mikroskopi, kültür, optokine duyarlılık testi, safrada erime deneyi) kadar duyarlı olduklarına karar verildi. Real-time PCR yönteminin pnömokokların tanısında konvansiyonel PCR yönteminden daha duyarlı ve seçici olduğu ve laboratuarda güvenle kullanılabileceği kanısına varıldı.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ISOLATES OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE RECOVERED FROM COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA WITH MOLECULAR METHODS

Streptococcus pneumoniae is the leading microorganism in the etiology of community acquired pneumonia and continues to be an important cause of morbidity and mortality despite vaccination and antimicrobial therapy. Community acquired pneumonia is a frequent and potentially fatal infectious disease with a high cost of therapy. In spite of the sophisticated diagnostic procedures today, the etiologic microorganisms can not be determined in more than half of the patients with community acquired pneumonia.

Traditional methods used for the identification of pneumococci are optochin susceptibility test, bile solubility test, and serologic tests. Recently, molecular diagnostic methods, which are based on the replication of nucleic acids in vitro conditions, are being used for the diagnosis of etiologic agents in community acquired pneumonia. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), a method quantifying the amount of DNA/RNA in the specimen, is being increasingly used for the identification of *S. pneumoniae* in addition to conventional polymerase chain reaction (PCR).

The aim of this study was to identify the *S. pneumoniae* with PCR and real-time PCR from isolates of samples from lower respiratory tracts of patients with community acquired pneumonia and diagnosed to be *S. pneumoniae* with classical diagnostic methods, and also to compare these methods from the aspect of sensitivity and specificity.

In this study, samples of sputum, tracheal aspiration, bronchoalveolar lavage (BAL), and pleural effusion that were obtained from adult patients with probable lower respiratory tract infection between January 2004 and January 2005, were assessed. Specimens that had typical appearance of *S. pneumoniae* in Gram staining

were cultivated onto 5% sheep blood agar. Optochin susceptibility test and bile solubility test were applied to the colonies causing alpha hemolysis on blood agar. Those isolates that were thought to be pneumococci with classical methods were analyzed again with PCR and real-time PCR, and the results were compared.

A total of 180 lower respiratory tract samples were assessed, of which 139 (77.2%) were sputum, 16 (8.9%) were BAL, 16 (8.9%) were tracheal aspirates and 9 (5%) were pleural fluid. Of the patients, 46.6% were men, and 53.3% were women. Ninety one (65.5%) sputum samples, 3 (18.7%) BAL samples, 6 (37.5%) tracheal aspiration samples, 4 (44.5%) pleural effusion samples were alpha hemolytic specimens, and showed typical morphologic appearance of pneumococci. These samples were accepted as culture positive, and optochin susceptibility test and bile solubility test were applied. Sixty five (62.5%) of 104 culture positive isolates were optochin sensitive, 12 (11.5%) had low sensitivity, and 27 (26%) were optochin resistant. Of the 104 isolates, 73 (70.2%) isolates were found to be positive with bile solubility test, and 31 (29.8%) were negative. Bile solubility test was found to be positive in all of the 65 optochin sensitive isolates. Eight (66.7%) of the 12 isolates with low sensitivity to optochin were positive with bile solubility test, and 4 (33.3%) of them were negative. All of the 27 optochin resistant isolates were negative in bile solubility test.

Of the culture positive isolates, 55 (60.4%) sputum samples were positive with conventional PCR, and 36 (39.6%) were negative. Three (75%) pleural fluid samples were positive, and 1 (25%) sample was negative with conventional PCR. All of the samples of BAL and tracheal aspiration were found to be positive with conventional PCR. Sixty one (67%) of sputum samples were positive, and 30 (33%) were negative with real-time PCR. Of the pleural fluid samples, 3 (75%) were positive, and 1 (25%) was negative with real-time PCR. All of the BAL samples and tracheal aspiration samples were positive in real-time PCR too. While 67 (64.4%) of 104 culture positive isolates were found to be positive with both PCR and real-time PCR, 31 (29.8%) isolates were found to be negative with both tests. Six (5.8%) isolates that were negative with PCR, were found to be positive with real-time PCR.

In conclusion, conventional PCR and real-time PCR were observed to be as sensitive as other classical methods (microscopy, cultivation, optochin susceptibility test, bile solubility test) in the diagnosis of *S. pneumoniae*. Real-time PCR method is more sensitive and specific than conventional PCR in the diagnosis of pneumococci, and can be used safely in daily laboratory practice.



BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Streptococcus pneumoniae, otitis media, sinuzit, pnömoni, bakteriyemi ve menenjit gibi hastalıklara sebep olan yaygın bir insan patojenidir. Pnömonokoklar ilk izole edildiğinden beri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Fakat virulans mekanizması hala tam olarak anlaşılammıştır (1). Aşı ve antibiyotik tedavisine rağmen pnömokok infeksiyonları çocuk ve erişkinde mortalite ve morbiditenin önemli bir sebebi olmaya devam etmektedir (2).

Streptococcus pneumoniae infeksiyonlarına geleneksel olarak biyokimyasal ve immünokimyasal tanı yöntemleriyle kombine edilmiş bakteriel kültürler kullanılarak tanı konur. Hasta örnekleri toplanmasından önce antibiyotik kullanımı veya örnek transportu sırasında *S. pneumoniae* 'nin otolizi negatif kültür sonucuna neden olabilir. Değişik vücut sıvılarında pnömokokların varlığını gösteren bazı antijen gösterme metodları geliştirilmiştir, fakat bu metodların duyarlılığı değişkendir (3). Temel olarak pnömokok antijenlerine ait antikorların ölçülmesi için serolojik metodlar kullanılmaktadır. Ancak bunlar çift örnek gerektirdiğinden hızlı tanı için kullanılmazlar (4).

Pnömonokokların sebep olduğu hastalıkların tanısını iyileştirmek için pnömokokların duyarlı ve spesifik tanısında yeni ve hızlı metodlara gereksinim duyulmaktadır. Moleküler yöntemlerin kullanımı, son yıllarda tıbbın her alanında olduğu gibi, mikrobiyolojide de hastalık etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanması ve etken miktarının kantitasyonu dahil birçok alanda yaygın olarak tercih edilmektedir. *Streptococcus pneumoniae* 'ye ait ilk nükleik asit amplifikasyon metodu 1993'te yayınlanmış (5) ve o zamandan beri pnömokokların pneumolizin ve otolizin genlerine ait bölgeleri kodlayan farklı DNA dizilerinin amplifikasyonuna dayalı birtakım metodlar tanımlanmıştır (6).

Konvansiyonel PCR'ın bir modifikasyonu olan real-time (gerçek zamanlı) PCR 1990'ların sonlarında bulunmuş bir yöntemdir. Bu yöntemde amplifikasyon ürünleri amplifikasyon sırasında tanımlanır ve sonuçlar kantitatif olarak verilir (7). Real-time PCR uygulamaları ile ilgili son yıllarda birçok yayın yapılmıştır (8-11).

Bu çalışmanın amacı, toplum kaynaklı pnömoni hastalarına ait alt solunum yolu örneklerinden soyutlanıp, klasik tanı yöntemleri ile *S. pneumoniae* olduğu saptanan klinik izolatları, konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) yöntemleri ile tanımlayarak bu yöntemleri duyarlılık ve seçicilik yönünden karşılaştırmaktır.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1. Tarihçe

Streptococcus pneumoniae veya pnömokoklar *Streptococcaceae* ailesinden *Streptococcus* genusunun bir türüdür. Pnömokoklar ilk olarak 1881'de Amerika Birleşik Devletleri'nde Sternberg ve Fransa'da Pasteur tarafından izole edilmiştir. Frankel-Weichselbaum'un çalışmaları ile 1886'da, pnömokokların özellikle lobar pnömoni yaptıkları ortaya çıkmıştır. Serolojik farklı tipler 1910'da tanımlanmıştır. Avery, MacLeod ve McCarty pnömokokal transformasyonda DNA'nın rolünü, 1944'de göstermişlerdir (12, 13).

2.1.2. Morfoloji ve Boyanma

Streptococcus pneumoniae'nin tipik görünümü, birbirine bakan yüzleri düz, diğer uçları sivri, boyları enlerinden daha uzun, mum alevi veya lanset biçiminde, 0.5-1.5 µm büyüklüğünde diplokoklar şeklindedir. İrin, balgam ve kültürlerde pnömokokların bu biçimlerinden oldukça farklı biçimlerine rastlamak mümkündür. Oval, bazen iki ucu sivri, tek tek koklar, diplokoklar ve özellikle sıvı ortamlarda 5-6 koklu, bazen daha uzun ve düz zincirler bazen basil zannedilecek kadar uzunca şekiller pnömokoklar için rastlanabilen görünüm değişiklikleridir. Balgam, irin ve seröz sıvılarda kısa zincirler halinde bulunurlar (12, 13).

Fakültatif anaerob, Gram (+), kapsüllü mikroorganizmalardır. Hareketsiz ve sporsuzdurlar. Organizmadan yeni ayrıldıklarında tipe özgü geniş veya dar kapsülleri vardır. Kan, serum, haben gibi proteinli besiyerlerindeki pasajlarda kapsül oluşumu devam eder, diğer besiyerlerinde ise kısa zamanda kaybolur. Tipe özel homolog serumlarla yapılan kapsül şişme reaksiyonu ile kapsüller gösterilebilir (12, 13).

2.1.3. Kültür Özellikleri

Buyyon, jeloz gibi basit besiyerlerinde güç, kan serum ve haben gibi maddelerle zenginleştirilmiş ortamlarda kolaylıkla ürerler. Genellikle %5 CO₂'li

ortamda daha iyi ürerler. Serumlu buyyonda homojen bulanıklık yaparlar. İçinde serum bulunan katı besiyerlerinin yüzeyinde 24-36 saat sonra küçük, nemli, hafif bulanık, yuvarlak ve az kabarık, 0.5-1.5 mm çapında koloniler oluştururlar. Kapsül maddesi fazla olan bakteriler daha büyük ve mukoid koloniler meydana getirirler (12, 13).

Optimal üreme ısısı 37°C (25-42°C'ler arasında da ürer) ve pH 7.4-7.8'dir. Aerop koşullarda üretildiğinde, oksijene duyarlı ve streptolizin-O benzeri pneumolizin-O etkisi ile koloni çevresinde bir beta hemoliz zonu oluştururlar. Oksijenli ortamda metabolizma ürünü olarak H₂O₂ yaparlar. Peroksidaz ve katalaz negatif olduğundan, bu maddeyi parçalayamazlar ve toksik etki ile otoliz olup ölürler. Bu nedenle stok kültürleri için kanlı besiyerleri kullanılmalıdır (12, 13).

Pnömonoklarda S-R değişiklikleri görülür. Kapsüllü, virülan S kolonileri, homolog antiserumlarının bulunduğu besiyerinde kapsülsüz, kaba ve granüllü avirülan R koloni oluşturur. R kolonilerin buyyon kültürleri farelere inoküle edilirse, aynı tipin S şekline dönüşebilir. S formundan R formuna değişme, tip özelliğinin tam kaybıyla sonuçlanır. Pnömonokların tipe özgü yapıları kapsüllerine ve kapsülde bulunan polisakkarit yapısındaki spesifik soluble substance (SSS) maddesine bağlıdır. Kapsüllerini kaybeden pnömonoklar tip özelliklerini de kaybetmiş olurlar. Pnömonok infeksiyonları sırasında, anti-SSS antikorları oluşur. Hastalığın ileri dönemlerinde bu antikorların varlığında, organizmada da kapsülsüz ve R koloni değişimi gösteren pnömonokların meydana geldiği gösterilmiştir. Giffith 1928'de kapsülsüz, avirülan tip 2 pnömonoku, ısı ile öldürülmüş kapsüllü tip 3 pnömonokla birlikte farelere şırınga etmiş ve enfekte hayvanlardan canlı, virülan, kapsüllü, tip 3 pnömonoklarını izole etmiştir. Avery, MacLeod ve McCarthy bu fenomonde DNA'nın rolünü ortaya koyarak transformasyonu açıklamışlardır (12, 13).

Streptococcus pneumoniae karbonhidrat fermantasyonu yaparak çok miktarda laktik asit oluşturur ve enerjisini bu yolla sağlar. Glikozun parçalanmasıyla oluşan laktik asit, ortam pH'sını değiştirmesine ve uygun olmayan üreme koşullarının ortaya çıkmasına neden olur. Kanlı agarda alfa hemoliz yapan pnömonoklar, alfa hemolitik streptokok benzeri koloniler oluşturur. Bu iki bakteri grubunun ayırımında, inülin fermantasyonu, optokin duyarlılığı, safra ve safra tuzlarında otoliz olma ve deneysel patojenite gibi özellikler gözden geçirilir (12, 13).

Streptococcus pneumoniae inülini asit oluşturmak suretiyle parçalar. Optokine duyarlıdır. *Streptococcus pneumoniae*'nin sıvı besiyerindeki kültürlerine

% 10-20 sığır safrası veya % 2 safra tuzu eklendiğinde otoliz ve erime meydana gelir. Fareler için çok patojen olup, onları 48 saat içinde sepsis tablosu ile öldürür. Alfa hemolitik streptokoklar ise fareler için daha az patojendir (12, 13).

2.1.4. Antijen yapısı

Gram pozitif bakterilerin tipik hücre duvarı peptidoglikan ve teikoik asit yapısını gösterir. Teikoik asit polisakkarit olup, antijenik aktivite determinantlarına sahiptir. Kapsül antijeni, hapten özelliğinde bir polisakkarit bileşimidir. Kapsüller polisakkarit aglütinasyon, presipitasyon ve immunelektroforez yöntemleri ile gösterilebilir. Her tip için ayrı immunolojik karakter taşıyan bu maddeye SSS adı verilir. Bu maddenin antijenik özelliğine göre pnömokoklar serolojik olarak tiplendirilir ve tipler rakamlarla gösterilir (12, 13).

Eddy'nin araştırmaları ile *S. pneumoniae*'nin 85'ten fazla tipi bulunduğu gösterilmiştir. Kapsül mikroorganizma yüzeyinde hidrofilik jeller oluşturan büyük polisakkarit polimerlerinden meydana gelmiştir. Tip 3 polisakkaritinin yapısında birden fazla sellobiuronik asit bulunur. Çok geniş kapsüllü bu tipin kolonileri tam mukoid görünümündedir (12, 13).

Streptococcus pneumoniae serolojik olarak birçok şekilde tiplendirilir:

- a. Tipe özel antiserumlarla pnömokok aglütinasyonu
- b. Tipe özel antiserumlarla SSS presipitasyonu
- c. Kapsül şişme reaksiyonu

Kapsüller polisakkaritlerin tayininde tipler ve diğer bakteriler arasında çapraz reaksiyonların varlığı gösterilmiştir. Örneğin tip 2 ve 5, tip 3 ve 8, tip 7 ve 18, tip 15 ve 30 *S. pneumoniae* arasında böyle çapraz reaksiyonlar vardır. Ayrıca pnömokokkal kapsüller polisakkarit *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* 'lar, *Haemophilus influenzae* tip b ve viridans streptokokların polisakkaritleri ile de çapraz reaksiyon verebilmektedir. Bunlara ek olarak tip 14 polisakkaritinin Grup B streptokok tip III ve insan ABO kan grubu izoantijenleri ile de çapraz reaksiyonlarının varlığı saptanmıştır.

Streptococcus pneumoniae tiplendiriminde Amerikan ve Danimarka isimlendirimi kullanılmaktadır. Bu iki sistem arasındaki uyum Tablo 2.1'de gösterilmiştir (12, 13).

Tablo 2.1. *Streptococcus pneumoniae*'nin Amerikan ve Danimarka serotiplendirim örneği.

Amerika	Danimarka
1	1
2	2
3	3
6	6A
7	7A
9	9N
18	18F
19	19F
39	33C
40	33A
42	33B
79	28A
83	12A
84	47A

Streptococcus pneumoniae hücre duvarının asıl elemanı türe özel bir karbonhidrat olan polisakkarit C'dir. Teikoik asit polimeri olan C antijeni kolin, trideksidiaminoheksan, galaktozamin, ribitol, glikoz ve fosfat yapısındadır. Organizmada bu C maddesine karşı, onunla birleştiğinde presipitasyona yol açan C reaktif protein (CRP) adında bir karşıt madde oluşur. Özgül antikor niteliğinde olmayan bu CRP, çeşitli ateşli hastalıklarda serumda oluşur. Mol ağırlığı yaklaşık 11 000 dalton olan bir pentamerdir (12, 13).

Pnömonokların Forsman (F) antijeni lipoteikoik asit yapısındadır. Protein yapısındaki M antijenine karşı oluşan antikorlar, fagositozu inhibe etmez ve koruyucu değildir. Bu antijen *S. pyogenes* M proteininin analogudur. Pnömonokok tipleri arasında bu maddenin yapısal farklılıklarına rastlanmakta ise de, bu ayrımlar tiplendirimde yararlanılacak kadar özgül değildir. Pnömonokların R kolonilerinden bir de R protein antijeni elde edilmiştir (12, 13).

2.1.5. Patojenite

Pnömonokların nazofarinks kolonizasyonu için kullandığı mekanizmalar tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, siyalik asitin kolonizasyonu azalttığı, nöraminidaz etkisiyle siyalik asit rezidülerinin kesilmesi ile bakteri tutunmasının ve yayılımının arttığı belirlenmiştir (14).

Streptococcus pneumoniae ile oluşan hastalıklar esas olarak konağa saldıran mikroorganizmanın oluşturduğu yoğun inflamatuvar cevabın bir sonucudur. Pnömonokların spesifik antikapsüler antikor üretilene kadar, en azından fagositozdan kaçabilme yetenekleri hastalık oluşurmasında asıl kritik faktörü teşkil eder. *Streptococcus pyogenes* veya Gram negatif bakteriler tarafından üretilenlere benzer şekilde oldukça tahripkar toksinleri olmamasına karşın, sekonder rol oynayan çeşitli toksinler üretir. Organ tutulumuna bağlı hafif klinik değişiklikler oluşturur, ancak komşu organlara yayılımı nonspesifik klirens mekanizmalarından kaçma ve sonuçta konak inflamatuvar yanıtın aktivasyonu ile gelişir (14).

Tüm olgularda başlangıç olayı disakkarid GlcNAc2B14Gal içeren epitel hücre reseptörlerine, bakteriyel yüzey adhezinlerin bağlanması ile oluşan nazofaringeal kolonizasyondur (15). Pnömonoklar nazofarinksin normal bakteri florasında yer alırlar ve üst ya da alt solunum yolları epitelinde bir hasar oluşmadıkça varlıklarını kommensal olarak sürdürürler. Solunum yollarını döşeyen hücrelerde viral, mekanik veya kimyasal etkilerle meydana gelen anatomik değişiklikler o bölgede bakteriyel enfeksiyona zemin hazırlar. Üst solunum yollarının viral enfeksiyonları üstaki borusunda ödeme, orta kulakta negatif basınca neden olarak bakteriyel otitis mediaya zemin hazırlar ve bu enfeksiyonun en sık nedenleri arasında pnömonoklar yer alır (16).

Alt solunum yollarını yabancı cisim aspirasyonundan koruyan kompleks ve koordine bir takım nöromusküler reflekslerin bozulması akciğerlerin enfekte olması ile sonlanır. Normal akciğerlerde alveollere ulaşabilen bakteriler hızla oradan temizlenirler. *Influenza* virusu veya rinovirusların neden olduğu enfeksiyonlar, kimyasal ajanlar, travma veya aspire edilmiş materyaller alveolleri döşeyen hücrelerde hasar oluşumuna neden olarak bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmalarını geciktirir. Pnömonok hücre duvarındaki fragmanların ve pnömolizinin de inflamatuvar etkileriyle progressif bir enfeksiyonun başlamasına zemin hazırlanmış olur. Pnömolizin-O hücre membranı harabiyeti yapan sitolitik bir toksindir.

Dermatoksik ve öldürücü olan bu hemolizinin, insanlardaki etkinliği yeterli olarak bilinmemektedir (17).

Pnömonokoklar nöraminidaz enzimini oluştururlar. Bu enzim hücre membranı ve vücut sıvılarında bulunan glikoprotein ve glikolipide etki ederek, asetilnöraminik asiti ayırır ve pnömonokokların vücutta yayılımını artırır. Hücre dışı proteazları da vardır. Bu enzim Ig A, salgısal Ig A (s-Ig A), Ig G ve Ig M'yi parçalar (Tablo 2.2) (17).

Tablo 2.2. Pnömonokokkal oluşumların virulans özellikleri.

Pnömonokokkal Oluşum	Mekanizma
Kapsüler Polisakkarit	Fagositozu önler. Komplemanı aktive eder
Hücre Duvarı Polisakkaridi	Komplemanı aktive eder.
Pnömolizin	Sitotoksiktir. Komplemanı aktive eder.
Psp A	Fagositoza direnç gösterir.
Psa A	Adheransa yardımcı olur.
Otolizin	Bakteriyi parçalar.
Nöraminidaz	Adheransa yardımcı olur.

Bunlara ek olarak polimorf nüveli lökositlerin bölgeye migrasyonunu geciktiren alkol, anestetik ve kortikosteroid gibi maddeler pnömoninin yerleşmesini ve yayılmasını kolaylaştırır. Konak savunma mekanizmaları enfeksiyonu akciğer dokusuna sınırlamada yetersiz kaldığında bakteriler hiler lenf bezlerine ulaşır. Ductus torasikus aracılığı ile sistemik dolaşıma katılarak bakteriyemi oluştururlar (16).

Akciğer dokusunda pnömonokokların adheransını ve replikasyonunu artırabilen çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Bunlar hareketsiz durumda bulunan fibronektine pnömonokokların bağlanması ile gelişir. Fibronektin doku harabiyeti esnasında ortaya çıkar ve plateleti aktive edici reseptör olarak salınıp pnömosit gelişimini kolaylaştırır. Aynı zamanda da pnömonokokkal-C maddesine de bağlanabilir (15, 18).

Pnömonokoklar, çocuklarda erişkinlere göre daha sık olarak nazofarinks mukoza bariyerini geçip servikal lenf yolları aracılığıyla sistemik dolaşıma

katılabilirler. Böylece herhangi bir infeksiyon odağı olmaksızın meydana gelen bakteriyemi özellikle meninksler, eklem ve periton gibi seröz boşluklara yayılarak metastatik odaklar meydana getirir. Bunun dışında menenjit, infeksiyonun paranasal sinüsler veya orta kulaktan yayılması ile meydana gelebilir. Ampiyem veya perikardit ise infeksiyonun akciğerlerden yayılımı sonunda oluşabilir. Bakteriyemi ile seyreden infeksiyonların komplikasyonu olarak gözlenen endokardit ise genellikle 40 yaşın üzerindeki kişilerde görülür (15).

Kapsüllü bakteriler, opsonik etki ile antikorları nötralize ettiğinden, fagositoza dirençli, kapsülsüz bakteriler ise oldukça duyarlıdır. Bu nedenle, antikor fonksiyon bozukluğu bulunan bireyler (örneğin; konjenital agammaglobulinemi, selektif immunoglobulin altgrup eksikliği, multipl myeloma, kronik lenfositik lösemi ya da lenfoma) invaziv infeksiyonlar için belirgin bir risk altındadır. Konjenital ve kazanılmış aspleni (iyatrojenik ya da orak hücreli anemi) erken dönemde çeşitli kompleman defektlerine zemin hazırlar. Asplenik hastalar, kontrol edilemeyen bakteriyemilerden ötürü klinik durumlarının hızla bozulması nedeniyle özel bir bakıma gereksinim duyarlar (15).

Alkolizm, siroz, renal yetmezlik, nefrotik sendrom, kronik pulmoner hastalıklar, konjestif kalp yetmezliği ve diyabet gibi çeşitli kronik hastalığa sahip olanlar pnömokok infeksiyonları için risk grubunu teşkil eder. Benzer şekilde organ ya da kemik iliği transplantasyonu yapılan ya da alkalleyici ajanlar, antimetabolit ve glukokortikosteroid tedavisi görenler ayrıca riskli hastalardır (15).

Kapsüllü mikroorganizmalar insan ve deney hayvanları için yüksek derecede patojen ve virülandır. Serumlarında kapsül polisakkaritine karşı antikor bulunanlar, o tip pnömokok infeksiyonuna karşı dayanıklılık göstermektedir ya da spontan iyileşme bu antikorların varlığına bağlıdır. Bu antikorlar komplemanın da etkisi ile enfekte eden pnömokokların çevresindeki polisakkarit kapsüle bağlanarak hem onları birbirine yapıştırır hem de fagosite olmalarını sağlar. Oluşan antikorlar IgM ve IgG sınıfından antikorlardır. Kişide agamaglobinemi ve disgamaglobinemi olmadıkça aynı kapsüller tiple reinfeksiyon son derece nadirdir (19).

Gerçek mekanizma ne olursa olsun, *S. pneumoniae* genetik mühendislik yöntemiyle kapsül kaldırıldığında avirülan hale gelen bir bakteridir (15).

2.1.6. Yaptığı Hastalıklar

Streptococcus pneumoniae pnömokkal pnömoni etkenidir. Bu enfeksiyona predispozisyon yaratan bazı faktörler mevcuttur :

1. Solunum yolu anomalileri: bronşlarda darlık, atelektazi, allerji,
2. Mukosilyer fonksiyonu bozan irritasyonlar,
3. Alkol ve ilaç intoksikasyonları (fagositoz ve öksürük refleks aktivitesi üzerine olumsuz etki yaparak),
4. Dolaşım dinamiğinin bozulması (pulmoner konjesyon),
5. Beslenme bozukluğu ve diğer sistemik hastalıkların varlığı,
6. Üst solunum yolunun viral enfeksiyonları,
7. Soğğun olumsuz etkisi (13).

Streptococcus pneumoniae'nin epitel hücrelerine adezyonundan sorumlu pnömokokkal adezin, bireyin hücrelerinin glikoprotein reseptörüne tutunan bir protein olarak tanımlanmıştır. Organizma bazı savunma mekanizmaları ile *S. pneumoniae*'nin yerleşmesini önlemeye çalışır. Bu mekanizmalar:

1. Epiglottal refleks (sekresyonların aspirasyonlarını önlemeye çalışır),
2. Yapışkan mukus varlığı,
3. Solunum yolu epitelinin siliaları,
4. Öksürük refleksi,
5. Terminal bronş ve bronşiyollerini direne eden lenfatikler,
6. Mononükleer alveoler hücrelerin etkinliği

şeklinde özetlenebilir (13).

2.1.6.1. *Streptococcus pneumoniae* Pnömonisi

Pnömokoksik pnömoni erişkinlerdeki pnömoni olgularının % 10-35'inden sorumludur. Pnömokoklar insan için son derece patojen olan aerob bakterilerdir. Virülan suşlarda bulunan polisakkarit yapısındaki kapsüle göre 85'ten fazla serotip tanımlanmıştır. Kapsül maddesi antifagositerdir ve bakterinin yayılcılığında sorumludur. Kapsül maddesi oluşturamayan R biçimindeki suşlar patojen değildir. Özgül kapsüle karşı oluşan antikor opsoniktir ve polimorfonükleer lökositlerin fagositozunu kolaylaştırır (20).

Pnömoni, genellikle pnömokokların kolonize olduğu orofarinks florasının aspirasyonu ve solunum yollarında çoğalması sonucunda gelişir. Alveollerde çoğalan bakteriler, serum ve polimorfonükleer lökositlerin sızmasıyla birlikte şiddetli bir

yangısal yanıtı neden olur. İnfeksiyon alveol duvarlarından yayılır ve segmenter ya da lobar infiltratlar oluşur. Tipe özgü antikorun olmadığı zaman alternatif kompleman yolu aktive olur ve pnömokoklar üzerinde C3 birikmesine yol açarak opsonizasyonu sağlar. Birkaç gün sonra tipe özgü antikorlar da oluşturulur ve fagositoz belirgin bir biçimde artar (20, 21).

Streptococcus pneumoniae sağlıklı kişilerin dörtte birinin nazofarinksinde kolonize olmuştur. Kolonizasyon pnömokoksik pnömoninin patogeneğinde önemli bir basamaktır. Aspire edilen pnömokoklar çoğalması ile infeksiyon gelişir. Pnömokokların orofarinksteki kolonizasyonunun biyolojisi üzerine bilinenler çok azdır. Epitel yüzeylerinin bakteri ekolojisini, bakteri adhezinleri ile epitel hücresi reseptörleri arasındaki etkileşimin belirlediği anlaşılmıştır. Örneğin A grubu streptokoklardaki lipoteikoik asitler, mukoza epitel hücreleri üzerinde biriken fibronektinin yağ asiti bağlayan yerleri ile etkileşime girmekte ve bunun sonucunda bakteriler mukoza yüzeylerine tutunmaktadırlar (20, 21).

Pnömokokların epitel hücrelerine tutunmaları ise öbür streptokoklara oranla daha zayıftır. Deneysel çalışmalarda pnömokoklar, sigara içenlerden elde edilen yanak epitel hücrelerine daha çok tutunmakta ve sigara içmeyenlerin epitel hücreleri sigara içenlerin tükürüğü ile inkübe edildiği zaman da pnömokokların bu hücrelere tutunması artmaktadır (21, 22).

Pnömokoksik pnömoninin klinik belirtileri sorumlu serotipe göre önemli bir değişiklik göstermemekle birlikte, tip 3'e bağlı pnömoni genellikle diyabet ve konjestif kalp yetmezliği gibi başka bir hastalığı olanlarda ve yaşlılarda ortaya çıkar. Bu nedenle tip 3 infeksiyonlarında prognozun daha kötü olduğu kabul edilmektedir. Erişkinlerde olağan lezyon, segmenter ya da lobar bir dağılım gösterir, ancak çocuklarda ve yaşlılarda bronkopnömoni de siktir (20).

Pnömoni bir kaç gün süren nezle ya da başka bir solunum yolu hastalığından sonra birden bire başlar. Titremeyle hızla yükselen ateş, taşikardi ve takipne vardır. Pnömokoksik pnömonide titreme nöbetinin yalnız bir kez olması tipiktir. Yineleyen titremeler *S. aureus*, *Klebsiella* türleri, sporsuz anaeroblar ve *S. pyogenes* gibi başka bir etiolojik etkeni düşündürmelidir. Yaşlı hastaların üçte birinde ateş olmaksızın yalnız takipne ve taşikardi bulunabilir (20). Birkaç saat içinde şiddetli bir yan ağrısı ve prodüktif bir öksürük gelişir. Balgam mukoid, sarı-kırmızımsıtrak ve pashlı görünümündedir. Bununla birlikte balgamın makroskopik görünümü pnömoninin

etyolojik etkeni için güvenilir bir gösterge değildir. Stafilokok, *Klebsiella* ve streptokok pnömonilerinde de balgam paslı olabilir (20, 23).

Hasta ağrıyan yanı üzerine yatar ve solunumu yüzeyseldir. Dispne ile birlikte hipoksemiye bağlı olarak dudaklarda ve tırnak yataklarında hafif bir siyanoz ortaya çıkabilir. Herpes labialis pnömokoksik pnömonide sık rastlanan bir komplikasyon olmakla birlikte bakteriyel olmayan pnömonilerin de aralarında bulunduğu hemen her ağır enfeksiyona eşlik edebilir. Tedavi edilmeyen vakalarda 39-40.5°C'lik yüksek ateş, yan ağrısı, öksürük ve balgam çıkarma yakınmaları sürekli, karında distansiyon sıktır (17, 24).

Pnömokok pnömonisinde tutulan lob ve segmentteki konsolidasyonun derecesine bağlı olarak çeşitli fizik muayene bulguları saptanır. İlgili hemitoraksta solunum hareketleri azalmış olabilir. Pnömonik konsolidasyon nedeniyle vibrasyon torasik artar ve bu bölgede matite vardır. Oskültasyonda krepitan raller duyulur. Alveollerin içi tümüyle eksüda ile dolduğu zaman tüber üfürüm alınmaya başlar. Konsolidasyon çözüldükçe yine krepitan raller işitilir (17, 20).

Başlangıçtan 7-10 gün sonra terleme ile birlikte ateş kriz biçiminde birden bire düşer ve dramatik bir iyileşme olur. Az sayıda vaka, ampiyem, menenjit ve endokardit gibi başka bir süpüratif komplikasyona bağlı olarak yitirilir (24). Pnömomokkal bir enfeksiyonla birlikte çeşitli komplikasyonlar görülebilir :

- Pnömomokkal menenjit, genellikle pnömoni, orta kulak iltihabı, mastoidit, sinüzit ve akciğer absesinden sonra, hematogen yayılım sonrasında gelişir. Bütün yaş gruplarında tekrarlayan menenjitin başlıca nedenidir. Bakteriyel menenjit klinik ve laboratuvar bulguları ile tanınır.
- Lober pnömoni komplikasyonu olarak pnömomokkal plevra ampiyemi, akciğer absesi gibi cerahatli lezyonlar oluşabilir.
- Mastoidit, otitis media, sinüzit, keratokonjonktivit, akut endokardit ve perikardit gelişebilir.
- Eklem iltihapları ve peritonit yapabilir (12).

2.1.7. Laboratuvar Tanısı

Streptococcus pneumoniae'nin tanısı organizmanın klinik örneklerden izolasyonuna dayanır. Bunun için mikroorganizmanın kültürde üretilmesi gereklidir. Bakteriyemi ile seyretmeyen olgularda pnömomokkların akciğer enfeksiyonundaki rolleri etkenin balgam, plevral sıvı, trakeal veya transtorasik aspirasyondan elde

edilen materyalde gösterilmesi ile kanıtlanır. Alt solunum yolu örneklerinin orofaringeal kontaminasyonunu önlemek için en iyi yol örneğin larinks altından alınmasını sağlamaktır (19- 21).

Balgam hekim gözetiminde derin bir ekspirasyonu takiben alınarak steril bir kaba konur ve makroskopik olarak incelenir. Pnömoni olgularında balgam kanlı, paslı ve yapışkan olup, zamanla irinli nitelik kazanır (12, 13). Gram yöntemi ile boyandığında polimorfonükleer lökositler ve Gram pozitif, lanset şeklinde diplokoklar görülür. Mikroskopik incelemeden sonra balgam kanlı agara ekilir ve % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilir. Kanlı agarda *S. pneumoniae* 24 saat içinde etrafı yeşil bir hemoliz zonu ile çevrilmiş, küçük koloniler şeklinde ürer. Bu kolonilerin alfa hemolitik streptokoklardan ayırımı yapılmalıdır. Bunun için bakterinin inülin fermentasyonu, safra tuzlarında erimesi, optokine duyarlılığı incelenir (25).

Pnömokoklar;

- İnülini fermente ederler.
- Safrada erirler.
- Optokine duyarlıdırlar.

Pnömokoklarda tiplendirme tipe özel bağışık serumlarla aglütinasyon ve kapsül şişme reaksiyonları ile yapılabilir. Gerek inceleme maddesinden ve gerekse kültürden hayvan deneyi yapmak olanaklıdır. Pnömokoklu balgam, irin gibi maddeler yada kültürde üretilmiş kolonilerden az bir kısmı peritonları içine verilen fareler 24-48 saat içinde sepsis ile ölürlür. Kalp kanlarında saf kültür halinde pnömokoklar saptanabilir.

Pnömokok infeksiyonlarında serolojik tanının pratik önemi yoktur. Bakterilerin soyutlanamadığı menenjit olgularında santrifüj edilen beyin omurilik sıyunun üstte kalan berrak kısmı başka bir tüpe aktarılır ve üzerine ince bir tabaka oluşturacak biçimde tipe özgül antiserum eklenir. Uygun tipten olan infeksiyonlarda tüpte presipitasyon bulanıklık halkası görülür. Karşıt immunelektroforez (CIE) ile pnömokoklar tiplendirilebildikleri gibi, bu yöntem ile vücut sıvıları (BOS, eklem sıvısı vb.) içerisinde pnömokok antijenleri araştırılarak hastalık tanısı konulabilir. Lateks ve koaglütinasyon ile BOS ve balgam dışındaki diğer klinik materyallerde antijen aramak için hazır ticari kitler vardır. Özellikle kemoterapi uygulanan ve bu yüzden klinik örneklerinde bakteri üretilmeyen hastaların serumları ve diğer vücut sıvılarında antijen saptayarak tanı koymanın değeri vardır. Pnömokokkal toplum

kaynaklı pnömoni tanısında hasta idrarında pnömokoklara ait antikorları araştıran ticari kitlerle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (26).

Streptococcus pneumoniae'nin tanısında moleküler yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Kearns ve ark. (8) kültürlerinde üreme olan ve olmayan klinik örneklerden yaptıkları çalışmada moleküler yöntemlerle tanıya gitmiş ve bulgularını serolojik testlerle karşılaştırmışlardır. Greiner ve ark. (10) kültürde ürettikleri örnekleri daha sonra moleküler testlerle araştırmışlardır. Vücut sıvılarında direkt olarak pnömokokların araştırılmasına yönelik moleküler yöntemler henüz araştırma safhasındadır (5, 27).

2.1.8. Tedavi

Pnömokoklar beta-laktam antibiyotiklere (başta penisilinler olmak üzere sefalosporinler ve karbapenemler) duyarlı organizmalardır. Ayrıca makrolidler, linkozamidler, glikopeptidler, kloramfenikol ve kullanıma yeni başlayan, Gram pozitif bakterileri de etki spektrumları içine alan kinolonlar da (trovafloksasin, sparfloksasin, gatifloksasin, grepafloksasin ve levofloksasin) pnömokoklara etkilidirler. Pnömokoklarda görülen beta-laktam direnci kromozomaldır ve penisilin bağlayan proteinleri (PBP) kodlayan genlerde oluşan değişikliklere bağlıdır (16).

Penisilin klinik kullanıma girmesinden bu yana yaklaşık yarım yüzyıldır pnömokok infeksiyonlarının tedavisinde penisilin başarıyla kullanılmaktadır. Ancak son yirmi yıldır Avrupa'da ve son on yıldır Amerika Birleşik Devletleri'nde pnömokoklarda penisiline direnç sorunu ortaya çıkmıştır (16). Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri 0.1-1 mg/ml arasında bulunan pnömokoklar penisilin için orta düzeyde, 2 mg/ml ve üzerinde bulunanlar ise yüksek düzeyde dirençli olarak kabul edilmektedir (12, 16).

Meningit dışında, orta düzeyde dirençli suşların neden olduğu infeksiyonlarda penisilin ile tedavide bir sorun yoktur. Penisiline orta ya da yüksek düzeyde dirençli suşlar aynı zamanda kloramfenikol, makrolidler, ko-trimoksazol ve klindamisin gibi diğer antibiyotiklere de dirençli olabilirler. Penisilinlere direnç gelişimi PBP'lerdeki değişikliklerle ilgili olduğundan, sefalosporinlerin penisiline dirençli suşlara etkileri azdır (16).

Beyin omurilik sıvısına iyi geçebilen seftriakson ve sefotaksim gibi üçüncü kuşak sefalosporinler penisiline dirençli pnömokok menenjitli olguların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu antibiyotiklere dirençli (MİK>0.5 mg/ml) suşlara bağlı

tedavi başarısızlıkları bildirilmiştir (16). Bu direnç problemleri nedeniyle etken mikroorganizmanın izolasyonu ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi klinikte çok önemlidir.

Bir aşırı duyarlılık yoksa pnömokoksik pnömoninin tedavisinde en seçkin antibiyotik penisilin G'dir. Penisiline duyarlı suşlara bağlı pnömoni için tedavi edici en düşük penisilin dozu 60.000 ünitenin bile altındadır. Erişkinlerdeki akciğer dışı odağı olmayan bakteriyemili ya da bakteriyemisiz infeksiyonlar intramüsküler olarak 12 saatte bir 600.000 ünite prokain penisilin ile güvenle tedavi edilebilir. Genel durumu bozuk ve toksik durumundaki hastalarda ise kanda yüksek ve düzenli penisilin konsantrasyonları sağlamak üzere tedaviye günde 12 milyon ünite kristalize penisilin G ile başlanabilir. Semptomatik tedavide yatak istirahati, yeterli sıvı alımı, plevral ağrı için analjezikler ve siyanoz da varsa oksijen inhalasyonu gerekir (Tablo 2.3) (15, 20, 28).

Penisilin tedavisine başlandıktan sonra 12-36 saat içerisinde ateş düşer, nabız ve solunum sayısı normale dönmeye başlar ve yangısal sürecin yayılması duraklar. Ancak vakaların yarısında ateşin normale dönmesi en az 4 gün sürer. Bu durumda başka bir endikasyon yoksa antibakteriyel tedavide acil bir değişiklik gerekmez. Tedavi hastanın ateşi normale döndükten sonra 3 gün daha sürdürülür. Radyografide akciğer bulgularının düzelmesi bir kaç haftayı bulabilir (20).

Tablo 2.3. Penisiline duyarlılıklarına göre *S. pneumoniae* pnömonilerinin tedavisi.

	Duyarlı (MIK<0.1 µg/mL)			Orta düzey dirençli (MIK<0.1-1.0 µg/mL)			Yüksek düzey dirençli (MIK≥2.0 µg/mL)		
	Çocuklar	Yetişkinler	Yetişkinler	Çocuklar	Yetişkinler	Yetişkinler	Çocuklar	Yetişkinler	Yetişkinler
İlk seçenek	Penisilin V (7 mg/kg, oral, 4x1, maks. doz. 500 mg) veya Penisilin G (16500 U/kg, iv, 6x1 maks doz 1 milyon U)	Penisilin V (500 mg oral, 4x1) veya Penisilin G (1 milyon U, iv, 6x1)	Amoksisilin (13.3 mg/kg, oral, 3x1, maks. doz 500 mg) veya Penisilin G (33 bin U/kg, iv, 6x1, maks. doz 2 milyon U)	Amoksisilin (13.3 mg/kg, oral, 3x1, maks. doz 500 mg) veya Penisilin G (33 bin U/kg, iv, 6x1, maks. doz 2 milyon U)	Amoksisilin (500 mg, oral, 3x1) veya Penisilin G (2 milyon U, iv, 6x1)	Amoksisilin (500 mg, oral, 3x1) veya Penisilin G (2 milyon U, iv, 6x1)	Sefpodosim (5 mg/kg, oral, 2x1, maks. doz 200 mg) veya Seftriakson (25 mg/kg, iv, 2x1, maks. doz 1 g)	Sefpodosim (200 mg, oral, 2x1) veya Seftriakson (1g iv, 2x1)	Sefpodosim (200 mg, oral, 2x1) veya Seftriakson (1g iv, 2x1)
İkinci seçenek	Amoksisilin (13.3 mg/kg, oral, 3x1, maks. doz 500 mg) veya Sefazolin (20 mg/kg, iv, 3x1, maks. doz 1 g)	Amoksisilin (500 mg, oral, 3x1) veya Sefazolin (1 g iv, 3x1)	Sefuroksim aksetil (15 mg/kg, oral, 2x1, maks. doz 500 mg) veya sefazolin (20 mg/kg, iv, 3x1, maks. doz 1 gr)	Sefuroksim aksetil (15 mg/kg, oral, 2x1, maks. doz 500 mg) veya sefazolin (20 mg/kg, iv, 3x1, maks. doz 1 gr)	Sefuroksim aksetil (500 mg, oral, 2x1) veya sefazolin (1 g, iv, 3x1)	Sefuroksim aksetil (500 mg, oral, 2x1) veya sefazolin (1 g, iv, 3x1)	Sefotaksim (25 mg/kg, iv, 4x1, maks. doz 1 g)	Sefotaksim (1gr, 4x1)	Sefotaksim (1gr, 4x1)
Penisilin allerjisi	Eritromisin (7.5 mg/kg, oral, 4x1 veya 5 mg/kg, iv, 4x1, maks. 500 mg/kg) Klindamisin (4 mg/kg, oral, 4x1 maks. doz 300 mg veya 8.3 mg/kg, iv, 3x1, maks. doz 300 mg)	Eritromisin (500 mg oral veya iv, 4x1) veya Klindamisin (300 mg oral, 4x1 veya 600 mg iv, 3x1)	Klindamisin (4 mg/kg oral, 4x1, maks. doz 300 mg veya 8.3 mg/kg, iv, 3x1, maks doz 600 mg)	Klindamisin (4 mg/kg oral, 4x1, maks. doz 300 mg veya 8.3 mg/kg, iv, 3x1, maks doz 600 mg)	Klindamisin (300 mg oral, 4x1 veya 600 mg iv, 3x1)	Klindamisin (300 mg oral, 4x1 veya 600 mg iv, 3x1)	Vankomisin (10 mg/kg iv, 4x1)	Vankomisin (1 g iv, 2x1)	Vankomisin (1 g iv, 2x1)

2.1.9. Epidemiyoloji

Streptococcus pneumoniae insanların zorunlu bir parazitidir. İnsanda nazofarinks kolonizasyon üyesi ya da çeşitli klinik sendromlarda etken olarak bulunabilir. Diğer memelilerden izolasyonu çok nadirdir. Üst solunum yollarının pnömokoklarla kolonizasyonu yaşamın ilk günlerinden itibaren oluşabilir. Genelde bir ya da iki (dörde kadar çıkabilir) kapsüler tip ile kolonizasyon görülür. Daha sonra çocukluk ve yetişkinlik yaşları boyunca aralıklı olarak kolonizasyon gelişir. Çocuklarda taşıyıcılık erişkinlere oranla daha fazladır (> % 40). Kış aylarında yüksek bir prevalansın bulunduğu mevsimsel bir kolonizasyon paterni görülür. Pnömokoklar mikroorganizmaların bulunduğu sekresyonlarla yaygın direkt temas sonucu insandan insana bulaşır. Günlük bakım merkezleri, cezaevleri, düşkünüleri ve askeri kışlalar gibi ortak yaşamsal alanları paylaşan bireyler, pnömokok infeksiyonları için risk altında bulunurlar (15, 16).

Bir kimse kısa ya da uzun süre pnömokok taşıyıcısı olabilir. Çeşitli tiplere ait olan bu pnömokoklardan bazen iki ve daha fazla tip bir arada bulunabilir. Bununla beraber yapılan araştırmalar, erişkinler için en patojen tipler olan tip 1, 2 ve 3 pnömokokların taşıyıcılık oranlarının düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bu üç serotip bakteriyemik pnömokokkal hastalıkların % 75'inden sorumlu tutulmaktadır. Bebek pnömonilerine en çok tip 14 neden olmaktadır. Çocuk pnömonilerine en çok tip 14, 6, 18, 19, 23, 1, 4 ve 9, erişkin pnömonilerine ise en çok tip 1, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 14 ve 19 neden olmaktadır (12, 13).

Alt solunum yollarında savunma mekanizmalarının etkinliği ile pnömokokkal infeksiyonlar daha az oranlarda görülür. Bu mekanizmalar; epiglot refleksi, bronşiyal epitelin mukus tabakası, solunum epitelindeki kirpikler, öksürük refleksi ve alveolar makrofajların temizleme fonksiyonudur (12, 13).

2.1.10. Korunma ve Kontrol

Pnömokok infeksiyonları bütün dünyayı ilgilendiren bir problemdir ve son yıllarda antibiyotiklere dirençli organizmalar nedeniyle üzerinde daha da dikkatli durulmaktadır. Çoğul dirençli pnömokoklara dünyanın her tarafında rastlanmakta ve daha önceleri benimsenmiş tedavi rejimleri dirençli suşlar nedeniyle yeniden gözden geçirilmektedir. Pnömokok infeksiyonlarını güvenli ve etkili aşularla önlemek hem antibiyotik direncinin gelişmesini önlemeye katkıda bulunacak hem de bu infeksiyonların kontrolünde daha etkili ve ekonomik olacaktır. Günümüzde mevcut

olan aşı 23 farklı polisakkaritin bir karışımını içerir. Bu aşı 2 yaşın altındaki çocuklarda immünojenik değildir. Çünkü küçük çocuklarda polisakkarit antijenlere karşı yeterli immün cevap yoktur. Hayatı tehdit eden pnömokok infeksiyonları için risk altında olan gruplarda konvansiyonel pnömokok aşısı ile immünizasyonu takiben az ya da orta düzeyde etki görülmüştür (16).

Pnömokok aşısı endikasyonları:

1. İleri yaş (65 yaş ve üzeri)
2. İlerlemiş kalp hastalığı
3. BOS kaçağı
4. Diabetes Mellitus
5. Alkolizm
6. Siroz
7. Kronik böbrek yetmezliği
8. Kronik akciğer hastalığı
9. Splenik disfonksiyon veya aspleni
10. Multipl myelom
11. Lenfoma
12. Hodgkin hastalığı
13. HIV infeksiyonu
14. Organ transplantasyonu

Pnömokok konjüge aşılarının geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar sürmektedir (29, 30). Polisakkaritlere, difteri ve tetanoz toksoidi gibi taşıyıcılara bağlanmak suretiyle antijenik özellik kazandırılmıştır. Yedi, 9 ve 11 değerlikli aşılar, taşıyıcı proteinleri tetanoz toksoidi, difteri toksoidi, CRM 197 (difteri toksoidinin bir mutant proteini), meningokok dış membran proteini ve kapsülsüz *H. influenzae* dış membran proteini olmak üzere faz I, faz II ve faz III çalışmalarını tamamlamak üzeredirler. Bu aşılara daha fazla polisakkarit eklemek teknik olarak kolay değildir ve daha çok dirençli suşların polisakkaritleri ile hazırlanmaktadır (16).

2.2. Toplum kökenli pnömoniler

Sir William Osler 1901'de yazdığı "The Principles and Practice of Medicine" adlı kitabında pnömoniden akut hastalıkların en yaygın ve en fatal olanı olarak bahsetmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde ölüm nedenleri arasında 6. sırayı, enfeksiyonlara bağlı ölümler arasında ise 1. sırayı almaktadır. Günümüzde çok sayıda antibiyotik kullanımına ve etkili aşılarla bağlı olarak enfeksiyon hastalıklarından ölümler azalmakta iken, alt solunum yolları enfeksiyonları içinde yer alan toplum kökenli pnömoni halen sık rastlanan, tedavi maliyeti yüksek ve ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. İleri yaş grubunda (65 yaş ve üzeri) olan ve temelde kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), diabetes mellitus (DM), böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı, kronik nörolojik hastalık, kronik karaciğer hastalığı ve malignite gibi ek hastalığı bulunanlarda pnömoni daha sık görülmekte ve daha ağır seyredebilmektedir (31-33).

Ayaktan tedavi edilen toplum kökenli pnömoni olgularında etkenlerin yaklaşık % 30'unu virüsler, % 45'ini atipik pnömoni etkeni bakteriler (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*) ve % 25'ini diğer bakteriler oluşturmaktadır. Hastanede yatarak tedavi gören hastalarda ise etiyolojiden % 60 oranında bakteriyel ajanlar sorumlu tutulmakta ve en sık pnömokoklar (% 27-55) soyutlanmaktadır. Geliştirilmekte olan ileri tanı yöntemlerine karşın, toplum kökenli pnömonilerin yarısından çoğunda etken mikroorganizma saptanamamakta, etkenin izole edilebildiği durumlarda ise kültür, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri belli bir zaman gerektirdiğinden, tedaviye başlamadaki gecikmenin morbidite ve mortaliteyi artırdığı düşünülmektedir (Tablo 2.4) (34-36).

Toplum kökenli pnömonide klinik tablo olası etkenler ve empirik tedavi yaklaşımı açısından iki farklı kategoride değerlendirilebilir.

1. Tipik Pnömoni: Akut başlayan, üşüme ve titreme ile ani yükselen ateş, lökositoz, öksürük, pürülan balgam çıkarma, plöretik tipte yan ağrısı, fizik muayenede inspiyum sonu ince raller, konsolidasyon bulguları (perküyonda matite, bronşiyal ses), radyografide sıklıkla lobar konsolidasyonla karakterize bakteriyel pnömonidir. En sık rastlanan etken *S. pneumoniae* 'dir.

2. Atipik Pnömoni: Daha çok genç kişilerde ateş, halsizlik, baş ağrısı gibi prodromal belirtiler ile birlikte subakut bir başlangıç, kuru veya mukoid balgamla birlikte öksürük, hırıltılı solunum gibi yakınmalarla karakterize, radyolojik olarak genellikle bilateral yamalı infiltratların görüldüğü, fizik muayene ve radyolojik

bulgular arasında çoğu kez uyumsuzluk olan, lökositozun olağan olmadığı, akciğer dışı sistemik organ tutulumuna ait semptom ve bulguların ön planda görülebildiği pnömonilerdir. Başlıca atipik pnömoni etkenleri *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* ve virüslerdir (31).

Tablo 2.4. Akut pnömonide etyolojik ajanlar.

<u>Bakterial ajanlar</u>	<u>Mycoplasma ve chlamydia</u>	<u>Viral ajanlar</u>
<p>Yaygın <i>S.pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>H. influenzae</i></p> <p>Mix anaerob bakteriler(aspirasyon) <i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Peptococcus</i> spp. <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Prevotella</i> <u>Enterobakteriler:</u> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Legionella</i> spp.</p> <p>Yaygın olmayan <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Actinomyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Campylobacter fetus</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Nocardia</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>S. pyogenes</i> <i>Yersinia pestis</i></p>	<p><i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i></p> <p>Mikobakteriyel <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Nontüberküloz mikobakteriler</p>	<p>Çocuklarda;</p> <p>Yaygın Respiratuar sinsityal virus Parainfluenza virus Tip 1,2,3 Influenza A virus</p> <p>Yaygın olmayan Adenovirus Tip 1,2,3,5 Influenza B virus Rhinovirus Coxsackievirus Echovirus Hantavirus</p> <p>Erişkinlerde;</p> <p>Yaygın Influenza A virus Influenza B virus Adenovirus Tip 4,7</p> <p>Yaygın olmayan Rhinovirus Adenovirus Tip 1,2,3,5 Enteroviruslar Echovirus Coxsackievirus Poliovirus Epstein-Barr virus Cytomegalovirus Respiratuar sinsityal virus Varisella-zoster virus Parainfluenza virus Herpes simplex virus Hantavirus Human herpesvirus 6</p>
	<p><u>Rickettsiyal ajanlar</u></p> <p><i>Coxiella burnetii</i> <i>Rickettsia rickettsiae</i></p>	
	<p><u>Fungal ajanlar</u></p> <p><i>Aspergillus</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida</i> spp. <i>Coccidioides immitis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i></p>	
	<p><u>Parazitik ajanlar</u></p> <p><i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Pneumocystis carini</i> <i>Strongiloides stercoralis</i> <i>Toxoplazma gondii</i> <i>Paragonimus westermani</i></p>	

2.2.1.Patogenez

Sağlıklı bireylerde karinanın altındaki bronkopulmoner ağaç sterilidir. Patojenlerin pnömoni oluşturabilmek için en uçtaki solunum yollarına ulaşmaları ve çoğalmaları gerekir. Pnömoni solunum sistemini infeksiyondan koruyan bir dizi konak savunma mekanizmasının alt edilmesi sonucunda gelişir (Tablo 2.5) (17).

Tablo 2.5. Solunum yolu hastalıklarında organizma savunma mekanizmaları.

Anatomik Lokalizasyon	Savunma Mekanizması
Üst Solunum Yolları Nazofarinks	Burun kılları Türbulans Üst solunum yollarının anatomisi Mukosilier oluşum Ig A sekresyonu
Orofarinks	Salya Epitel hücrelerinin uzaklaştırma etkisi Kompleman yapımı
Trakea, Bronşlar	Öksürük Epiglottik refleks Bronşlardaki dallanma noktaları Mukosilier oluşum İmmunoglobulin salgısı (IgG, IgM, IgA)
Alt Solunum Yolları Terminal hava yolları, alveoller	Alveolar salgılar (surfaktan, fibronektin, immünoglobulin, kompleman, serbest yağ asitleri, demir bağlayan proteinler) Sitokinler (TNF, IL-1, IL-8 ve diğerleri) Alveolar makrofajlar Polimorfonükleer lökositler

Mikroorganizmalar akciğere aspirasyon, aerosolizasyon ya da hematogen yayılma sonucunda ulaşırlar. En önemli mekanizmalar orofarinksten geçen sıvıların aspirasyonu ya da damlacık çekirdeklerinin inhalasyonudur. Normalde orofarinks materyalinin aspirasyonu sık görülürse de konak savunmalarının karşı koyması ve aspire edilen mikroorganizmaların patojenliğinin düşük olması nedeniyle kolay kolay pnömoni gelişmez. Bir metreküp havada 15-30 mikroorganizma vardır ve pnömoni oluşturmaya yetecek sayıda bakterinin en uçtaki hava yollarına ulaşması uzak bir olasılıktır (17, 20, 37)

Normalde burun vestibülündeki kılların ve nazofarinksin sağladığı aerodinamik filtrasyon, çapı 10 μm 'den büyük partiküllere ve çözülmüş durumdaki toksik gazlara geçit vermez. Çapı 3-10 μm arasında olan partiküller karinanın üstünde trakeaya çarpar ve mukoza yüzeyini kaplayan mukus içinde tutulurlar. Yarım μm 'den küçük partiküller akciğerde tutulmaz, ancak ekspirasyonla uzaklaştırılırlar. Bu nedenle akciğerlerin en uç kesimine ulaşan partiküllerin çapı 0.5-3 μm arasındadır. Birçok bakteri ve diğer mikroorganizmalar da bu büyüklüktedir (17, 20, 38).

Normalde epiglotun anatomik engeli ve refleks kapanışı gibi mekanik mekanizmalar, partiküllü maddelerin büyük hava yollarına ulaşmasını önler. Bronkopulmoner ağacın dallanması da büyük partiküllerin mukus içinde hapsedilip tutulmasını kolaylaştırır (17, 20).

Öksürük refleksi trakeobronşiyal ağacın aspire edilen materyalden temizlenmesini sağlar. Yüzeylerinde lipoprotein ve glikoprotein uzantıları olan bakteriler mukusta hapsedilirler. Mukusta tutulan bakteriler ya da başka partiküller terminel bronşiyollere dek uzanan epitelin kenarındaki titrek tüylerin hareketleri ile yukarılara taşınır (mukosilyer transport sistemi) (17, 20, 39).

Terminal bronşiyollerde, alveoler duktuslarda ve alveollerde biriken bakterilerin inaktivasyonundan ise başlıca alveoler makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler sorumludur. Bakterilerin alveoler makrofajlarca fagositozunda fibronektin de yardımcı olur. Burada yerleşik olarak bulunan alveoler makrofajlar ilk savunma hattını oluştururlar ve stafilokok gibi mikroorganizmaları savuşturabilirler. Gram negatif çomaklar ise in situ etkin bir öldürmenin olabilmesi için polimorfonükleer lökositlerce fagosite edilmelidirler. Bu nedenle akciğer kapillerlerindeki polimorfonükleer lökositlerin bronkoalveoler boşluklara geçmesi önem taşır (17, 20, 40).

Akciğerlerde bulunan immünoglobülinler kompleman sistemini aktive ederler. Alveoler makrofajlar antijenleri işlemde geçirirler ve bunun sonucunda akciğerdeki T-lenfositleri aktive olur. Bu sırada sitokinler gibi makrofajları aktive eden maddeler ve lökotrien B4 gibi C5a ile birlikte polimorfonükleer hücreleri çeken kemotaktik maddeler oluşturulur. Artık hücrel ve hümorale immünite gelişmiştir ve sonuçta alveol boşlukları konsolidasyona uğrar. Bu arada ölen lökositlerden proteolitik enzimler açığa çıkar ve akciğer dokusunu yıkıma uğratar (17).

Akciğerde doku yıkımını bir ölçüde önleyebilen inhibitör proteinler ve akciğer salgılarında transferrin, laktoferrin ve lizozim gibi yine antibakteriyel savunma işlevi olan birçok madde tanımlanmıştır. Tedaviye erken başlanması ya da enfeksiyonun belli mikroorganizmalara bağlı olması, akciğerin uğrayacağı yıkımın daha az olmasını sağlayabilir ve bu sayede akciğerin gaz değişim mekanizmaları bozulmaz (17, 20, 40).

Pnömoni her zaman konak savunmasının kusurlu olması sonucunda ortaya çıkmaz, ancak pnömonilerin çoğunda akciğerin normal konak savunma mekanizmalarından birinin bozuk olduğu söylenebilir. Kimi durumlarda belli bir konak savunması kusuru özgül bir pnömoni çeşidine neden olur (20). Normalde viruslar ve mantarlar, orofarinks florasının normal üyeleri değildir (41, 42). Üst solunum yollarının normal mikrop florasını anaerob koşullarda da üreyebilen fakültatif streptokok türleri ile birlikte *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, çeşitli *Neisseria* türleri ve bazen de stafilokoklar gibi bakteriler oluşturur. Dişlerin çevresindeki bölgelerde oral *Bacteroides* türleri, *Fusobacterium* türleri ve bazı spiroketler gibi çok sayıda anaerob bakteri vardır (41, 42).

Normal kişilerde orofarinks florası pek değişmez. Orofarinksin normal fizikokimyasal ortamına ve yerleşik floranın inhibitör maddeler yapmasına bağlı olarak yeni gelen bir bakteri türünün farinkste kolonize olması güçtür. Mukoza yüzeylerinin kolonizasyonu, bakterilerin yerel epitel hücrelerine tutunması ile olur ve bakterilerin hücre yüzeyine bağlanma yerlerini değişikliğe uğratan birçok patojenik etmen yerleşik olmayan bakterilerin de epitel hücrelerine tutunmasını sağlayabilir. Örneğin sigara kullanımı ve kronik bronşit, orofarinksin *S. pneumoniae* ve tiplendirilemeyen *H. influenzae* suşları ile kolonizasyonunu artırmaktadır (20).

Nozokomiyal pnömoni, toplum kökenli pnömoni gibi çoğunlukla aspirasyon sonucunda ortaya çıkar (43). Hematojen enfeksiyon oldukça nadirdir; aerosol pnömonisi ise ancak bağışıklığı baskılanmış hastalarda *Legionella* 'ya bağlı olarak

arasına ortaya çıkar (20). *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri, *Enterobacter* ve öteki *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin hastanede yatan hastaları kolonize ettikleri bilinmektedir. Bu türlerden biri normal sağlıklı ambulator bireylerin % 15'den daha azının orofarinksinde bulunurken, yoğun bakım ünitelerindeki hastaların % 40'tan çoğu yatırıldıktan sonraki 3-5 gün içinde Gram negatif çomaklarla kolonize olmaktadır. Bakteriye tutunma (adherans) ve farinks kolonizasyonundaki bu değişikliklik, bir ölçüde nozokomiyal pnömoninin benzersiz mikrobiyolojisini de açıklamaktadır. Bu bakterilerle kolonizasyonun nedeni tümüyle aydınlatılmamış olsa bile patogenetik mekanizmasının tükrükteki proteaz düzeylerinin artması ve hücre yüzeyindeki fibronektinin azalması olduğu düşünülmektedir (20).

Beslenme bozukluğunun bazı Gram negatif çomakların, özellikle *P. aeruginosa*'nın trakea epitel hücrelerine tutunmasını artırdığı da gösterilmiştir (20). Hasta kişilerin üst solunum yollarındaki yassı epitel hücreleri normal kişilerin epitel hücrelerine oranla daha çok Gram negatif bakteri absorbe etmektedir. Bu nedenle hastanede yatan hastalarda aspirasyon olduğu zaman alveollere daha çok bakteri ulaşmaktadır. Bu bakterilerin çoğu seruma dayanıklıdır ve akciğerdeki özgül olmayan antikorla opsonize olmamaktadır, çünkü glikoproteinler ve fibronektinde bir azalma söz konusudur (20).

Kronik akciğer hastalığı nedeniyle alt solunum yollarında yapısal kusurları olan ya da üst karın veya göğüs ameliyatı geçiren bireylerde pnömoni gelişmesi olasılığı son derece yüksektir. Hipnotik kullanımına bağlı bilinç değişikliği glottisin kapanmasını baskılar ve epileptikler ya da alkoliklerde olduğu gibi aspirasyona neden olur. Trakeal entübasyon da normal siliyer işlevi engeller ve aspire edilen mikroorganizmaların temizlenmesini güçleştirir. Öte yandan yapay solunum uygulanan hastalarda stres ülseri profilaksisi için H₂ reseptör blokörlerinin ve antasitlerin kullanılması mide pH'sını yükselterek mide salgularındaki bakteri çoğalmasını artırmaktadır. Daha sonra bu bakteriler aspire edilir ve nozokomiyal bir pnömoni ortaya çıkar (20).

Göğüs grafisinde tutulan akciğer alanında homojen bir opasite görülür, içerisinde hava bronkogramı olarak adlandırılan bronş gölgeleri seçilebilir. Birlikte kronik akciğer hastalığı olanlarda atipik konsolidasyon örneklerine rastlanabilir (20).

2.2.2. Komplikasyonlar

Birtakım yerel ya da uzak komplikasyonlar pnömokoksik pnömoninin tipik seyirini değiştirebilir. Bunlardan akciğerde olanlar atelektazi, rezolüsyonda gecikme ve abse, komşu yapılarda olanlar plevral efüzyon, ampiyem ve perikardittir. Pnömokoksik pnömonisi olan hastaların yarıya yakınında plevral efüzyon gelişebilirse de, ampiyem görülme sıklığı ancak % 1-5 arasındadır (44). Ayrıca paralitik ileus, akut mide dilatasyonu ve karaciğer işlev bozukluğunun yanı sıra bakteriyemik hastalarda artrit, infektif endokardit ve menenjit gibi metastatik infeksiyonlar da görülebilir ve bunların mortalitesi yüksektir. Pnömokoksik infeksiyonlara eğilim gösteren risk grupları arasında grip geçirenler, asplenik kişiler, AIDS hastaları ve multipl myelomu olanlar başta gelir (45).

2.3. *Streptococcus pneumoniae*'nin Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Moleküler teknikler bilimin birçok alanında olduğu gibi infeksiyon hastalıklarının erken tanısı, mikroorganizmaların tür ve alt tür düzeyinde ayrımlarının yapılması, antimikrobiklere direnç durumunun belirlenmesi, virulans genlerinin araştırılması, epidemilerin belirlenmesi ve izlenmesi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (46).

Amplifikasyon metodları günümüzde amplifiye ürünlerin hızlı tespitini sağlayan metotlarla kombine olarak kullanılmakta olup, rutin tanı için oldukça hassas hale gelmişlerdir. Amplifikasyon yöntemlerinin bu kadar hızlı gelişmesinde iki önemli keşfin büyük payı vardır. Bunlardan ilki termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* adlı bakteriden ısıya dirençli DNA polimeraz enziminin izolasyonudur. Bu enzim Taq DNA polimeraz olarak tanımlanmış olup, farklı ısı aralıklarında aktivitesini sürdürebilmektedir. İkinci önemli keşif bilgisayar kontrollü termal döngü cihazlarının (thermal cyclers) geliştirilmesi olmuştur (46).

Konvansiyonel PCR dışında RNA'nın amplifikasyonu için reverz transkriptaz PCR, ön amplifikasyonla elde edilen uzun gen dizileri içerisindeki daha spesifik ve kısa dizilerin amplifikasyonu için 'nested' PCR ve örnekteki birden fazla mikroorganizmaya ait veya bir mikroorganizmaya ait gen üzerindeki farklı bölgeleri aynı anda çoğaltmak amacıyla multipleks PCR yöntemleri geliştirilmiştir (46, 47).

Polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. İn vitro şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genom kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PCR'da in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması da yapılabilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak, kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için iki kilobazdan küçük, daha komplike enzim veya enzim karışımları ile beş kilobazdan daha büyük olabilmektedir (46).

İn vivo şartlarda DNA replikasyonu sırasında enzimler ilk olarak DNA'nın çift zincirli yapısını bozarak tek zincirli hale geçişini sağlar. Daha sonra RNA polimeraz sentezlenir ve replikasyon başlangıç bölgesinde tek zincirli hale dönüştürülmüş DNA zincirlerinden birisine komplementer RNA'nın oluşumu sağlanır. Bu DNA/RNA heterodupleksi DNA polimerazın bağlanması için bir başlatıcı bölge rolü oynar. Böylece DNA'nın komplementeri sentezlenir. PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng) içeren örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örneklerdeki hedef çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon) (46).

Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşısı, 20-30 baz çifti uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler (primer) RNA/DNA heterodupleksini oluşturmak amacıyla kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonunda hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birincisi tek sarmal DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (bağlanma). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her tek sarmal DNA zincirinin komplementeri oluşturulur (uzama). Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan çift sarmal DNA'lar yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 döngü tekrarlandığında birkaç saat içerisinde hedefin milyonlarca kopyası elde edilebilir (46) (Resim 2.1).

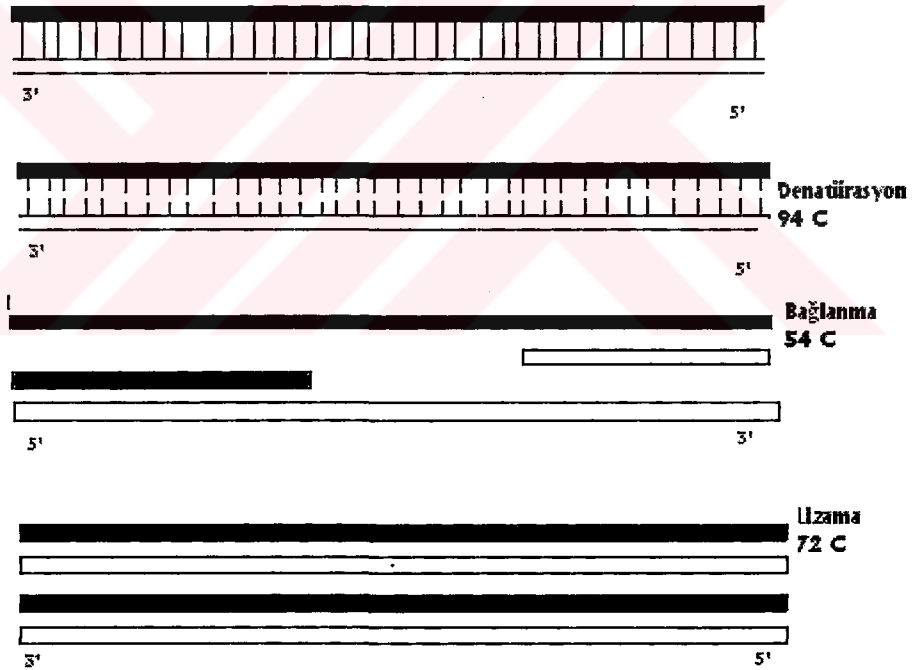
Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları:

1. Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96° C ısıyla tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda amplifikasyon sıklıkları başlamadan

önce 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon işleminin özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmiştir.

2. Bağlanma (annealing): Örnek birkaç dakika 30-60°C'de tutularak primerlerin tek zincirli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Isı, primerlerin yapısı ve erime ısısı (T_m = "melting temperature"; çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de yaklaşık olarak 20 baz çifti uzunluğuna sahip primerlerin kullanılması halinde 54°C olarak belirlenmektedir.

3. Uzama (extension): Polimeraz enzimi yardımı ile tek zincirli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5' → 3' yönde uzatılmasıdır.



Resim 2.1. PCR'daki aşamalar

Üç aşamada meydana gelen bu reaksiyon tek bir döngü (siklus) olarak adlandırılır ve ısıyı süratle yükseltip alçaltan "thermal cycles" denilen otomatik bir cihazda gerçekleşir. Bu işlem 30-40 kez tekrarlandığında, başlangıçta tek bir adet

olan DNA molekülünün sayısı her siklusun sonunda ikiye katlanarak artar ve milyonlarla ifade edilir düzeye gelir (46).

2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri

Multipleks PCR

Bu teknik birçok infeksiyonun tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma veya aynı bakteri geni üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak, çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir. Her bir primer çiftine özgül, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde gözlenmesi ile klinik örnekte mikroorganizmaların varlığı ve identifikasyonu aynı anda yapılabilmektedir (47).

“Broad-Range” PCR veya “Consensus” PCR

Bu teknik sepsis ve menenjitte etken olabilecek bakteriyel, viral ve paraziter patojenlerin önemli bir kısmının kısa sürede gösterilmesi ve identifikasyonu amacıyla denenmiştir (47). Bu yöntemde bütün bakteriler veya bir cinsin tüm türleri için ortak olan gen bölgesini çoğaltabilecek özellikte bir çift primer ile amplifikasyon yapılmaktadır. Elde edilen ampikonun baz dizi analizi yapılarak veya belirli bir patojene özgül proba hibridizasyon uygulanarak spesifik etkenin tanısı konulmaktadır. Ortak hedef moleküller olarak, filogenetik yönden bilgi sağlayıcı genetik moleküller içerisindeki bakteriler arasında korunmuş olan baz dizilim bölgesi kullanılmaktadır. Korunmuş hedef bölge mikroorganizmaların büyük bir grubunun amplifikasyonunu sağlar. Daha sonra amplifikasyon ürünü (ampikon) içindeki “hipervariable” bölgelerden (signature sequences) yararlanılarak mikroorganizmanın identifikasyonu yapılır. Bu yöntemin klinik tanıda uygulanılmasındaki en önemli problem, çalışılan örnekte çevreden bulaşmış kommensal bakteri veya normal flora elemanlarının bulunması halinde değerlendirmede zorluklar yaşanmasıdır (48).

“Nested” ve “Seminested” PCR

İki aşamalı amplifikasyon yöntemleridir. “Nested” PCR’da, ilk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır (15-30 siklus). Sonra bu amplifikasyon tüpünden

alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle çoğaltılmaktadır (15-30 siklus). İner primer, outer primerlerin bağlanma yerlerinin iç kısmında kalan, kendilerine özgül yerlerine tutunmaktadırlar. "Seminested" PCR'da ise ikinci aşamada kullanılan primerlerden biri içerden, diğeri outer primerle aynı yerden başlamaktadır.

Örnekte tek bir hedef DNA molekül bulunsa bile, iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül, herhangi bir yalancı negatiflik olmadan, kolayca gözlenebilmektedir. Bu yöntemler ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Duyarlılığın çok yüksek olmasına bağlı olarak gözlenebilen önemli bir dezavantaj, birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci amplifikasyon tüpüne aktarılırken, ürün çok az miktarda dahi çevreye saçılırsa sonraki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir (48).

"Nested" PCR'ın ilk aşamasında "broad-range" PCR, ikinci aşamasında multipleks PCR uygulanarak, klinik örneklerde bulunabilecek birden fazla mikroorganizmanın aynı anda, duyarlı bir şekilde saptanması mümkün olabilmektedir (49).

"In situ" PCR

PCR ile ilgili çalışmalarda diğeri önemli bir aşama, lam üzerine tesbit edilen enfekte hücrede bulunan mikroorganizmaya ait hedef DNA'nın amplifikasyonu ve sonucun "in situ" hibridizasyonla gösterilmesidir. Kısaca lam üzerine doku veya hücreler konduktan sonra, havada kurutulur ve 105°C'de 30 saniye bekletilir. Paraformaldehitli fosfat tamponlu tuzlu su (% 2'lik) ile bir saat işleme alınır. 3 x 0.1 M PBS (phosphat buffer saline) ile bir kere, 1 x 0.1 M PBS ile üç defa yıkanır. Proteinaz K enzimi (5µg/ml) ile 55°C'de iki saat muamele edildikten sonra, 96°C'de iki dakika tutularak Proteinaz K inaktive edilir. Lam su ile yıkanır ve havada kurutulur. Sonra lamın üzerine amplifikasyon solüsyonu eklenir ve plastik kapakla kapatılır. Plastik kapağın etrafı oje ile çevrilir. Lam, otomatik termal"cycler" üzerine konulur. Alüminyum kağıtla kapatıldıktan sonra amplifikasyon başlatılır. Amplifikasyondan sonra lam absolü etil alkol içinde 3-5 dakika tutulur. Sonra 92°C'de 30 saniye denatürasyon sağlanır ve 2 x SSC (sodyum klorür + sodyum sitrat) tamponu ile yıkanır. Bunu takiben özgül problarla "in situ" hibridizasyon

yapılarak amplifikasyon sonucu gözlenir. Bu yöntemin en önemli avantajı amplifikasyon hücre içinde gerçekleştiği için ampliconlara bağlı kontaminasyon olmamasıdır (48).

“Hot-Start” PCR

Normal PCR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte ve bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bunu önlemek için geliştirilmiş olan “hot-start” PCR tekniğinde temel maddelerden (polimeraz, nükleotitler, Mg^{+2} veya primerler) biri başlangıçta amplifikasyon tüpüne konulmamaktadır. Bu karışıma ilk denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra eksik olan madde eklenir ve sıcaklık normal bağlanma derecesine soğutulur. Böylece özgül primer bağlanması gerçekleşir. Bu aşamadan sonra uygulanan amplifikasyon sonucunda daha net DNA bandı elde edilir (48).

“Touchdown” PCR

Optimal primer bağlanma derecesini saptamak amacıyla geliştirilen bu yöntemde bağlanma sıcaklığı, sikluslar arasında, 1-2°C düşürülerek uygun derece belirlenmekte ve bu sıcaklıkta kalan amplifikasyon siklusları tamamlanmaktadır. Amplifikasyonun ilk siklusunda bağlanma derecesi olarak, hesaplanan T_m derecesinin yaklaşık 15°C üzerinden başlanmakta, takip eden sikluslar esnasında 1-2 derece düşürülerek T_m derecesinin takriben 5°C üzerine kadar gelmektedir. Böylece hedef bölgeye özgü ampliconlar elde edilmektedir (48).

2.3.3. Real-Time PCR

Real-time (gerçek zamanlı) PCR geleneksel PCR'ın bir modifikasyonudur ve ilk olarak 1990'ların sonlarında tanımlanmıştır. PCR çalışmalarında gelinen son noktadır. Real-time PCR'da amplifikasyon ve amplifikasyon ürünlerinin saptanması aynı anda gerçekleşir. Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile kısa sürede sonuç veren bir yöntemdir. Termalcycler ile beraber bir mikrovölümlü flormetre entegre edilmiştir ve bu sayede amplifikasyon ürünlerinin saptanması mümkün olmaktadır (7).

Real-time PCR yöntemi kalıp DNA/RNA miktarını kantite eden, spesifik, duyarlı, tekrarlanabilir bir alternatiftir. Kantitasyon amaçlı PCR sonrası işlemleri

ortadan kaldırması, duyarlılığının yüksek, kontaminasyon riskinin düşük olması, potansiyel hata kaynağı olan PCR sonrası işlemlerin elimine edilmesi ve geniş bir dinamik aralığa (10^1 - 10^8) sahip olması yöntemin en önemli avantajlarıdır (48-51).

Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIORAD)'dır. LightCycler sisteminde yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Cyber Green) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanması takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (51).

Bu uygulamada floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya entegre olan boya, ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime ısısına (T_m) sahiptir. PCR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru ya da yanlış olduğuna karar verilir (48).

LightCycler sisteminin diğer bir uygulama şekli hedefe özgül prob kullanmaktır. Burada problarla testin özgüllüğü artırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan (donör boya), diğeri 5' ucundan (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Proplar hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesi ile açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. "Fluorescence resonance energy transfer" (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (48).

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein = 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine = TAMRA) bulunmaktadır. Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (52).

Real-time PCR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (53).

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Ocak 2004-Ocak 2005 tarihleri arasındaki bir yıllık dönemde Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Av. Cengiz Gökçek Devlet Hastanesi, Sosyal Sigortalar Kurumu Gaziantep Bölge Hastanesi ve Özel Sani Konukoğlu Tıp Merkezi Göğüs Hastalıkları Polikliniklerine başvuran ve bu kurumlardaki konsultan hekimler tarafından klinik durumları değerlendirilerek, pnömokoksik pnömoni öntanısı alan hastalara ait örnekler değerlendirilmiştir.

Bu hastalardan pnömoni etkenlerini soyutlamak üzere alınan balgam, plevra, trakeal aspirasyon sıvısı ve bronş aspirasyon sıvısı örnekleri steril kaplar ya da tüpler içerisinde toplanarak en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı. Malignitesi, karaciğer yetmezliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği olan ve son bir hafta içinde antibiyotik tedavisi almış olan hastalara ait örnekler çalışma kapsamına alınmadı.

Bakteriyolojik tanı için örneklerin Gram boyaması ve kültürleri yapılarak bulgular not edildi. Besiyerinde kültürü yapılarak soyutlanan izolatlar arasından *S. pneumoniae* olduğu kuşku edilen suşlar ayrılarak, klasik yöntemler ile bakteri identifikasyonu yapıldı. Tanımlanan suşların moleküler tanısı önce konvansiyonel PCR yöntemiyle, daha sonra real-time PCR yöntemiyle çalışılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.1. Klasik Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri

3.1.1 Mikroskopik İnceleme

Laboratuvara gelen balgam, trakeal aspirasyon sıvısı, plevra sıvısı ve bronş aspirasyon sıvısının örnekleri bakteriyolojik incelemeye alınmadan önce kalite yönünden incelenmeye değer olup olmadığı araştırıldı. Belirgin olarak tükürükten ibaret olduğu görülen balgamlar incelemeye alınmadı. Preparatlar balgamın irinli kısmından hazırlanarak Gram boyama yöntemiyle boyandı. Mikroskopik olarak 100'lük büyütmeyle incelenen preparatların içerdikleri hücre sayıları not edildi. Buna göre, incelenen her sahada 25'ten fazla nötrofil ve 10'dan az epitel hücresi bulunan balgam örnekleri alt solunum yolları açısından uygun örnekler olarak kabul edildi ve ileri inceleme için ayrıldı (54).

Gram boyamada *S. pneumoniae*'nin tipik görünümüne sahip olan (Gram pozitif, birbirine bakan yüzleri düz, diğer uçları sivri, boyları enlerinden daha uzun, mum alevi veya lanset biçiminde, kısa zincirler halinde bulunan diplokoklar) örnekler ayrılarak çalışma kapsamına alındı (12).

3.1.2. Kültür

Örneklerin kültür ekimleri balgamın pürülan, mukopürülan veya kanlı kısımlarından, trakeal aspirasyon sıvısı ve bronş aspirasyon sıvısının varsa pürülan kısımlarından, plevra örnekleri ise doğrudan %5 koyun kanlı agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) yapıldı. Kültürler 18-24 saat 37°C'de aerobik ortamda inkübasyondan sonra incelendi. Kanlı besiyerinde alfa hemoliz oluşturan, küçük, yuvarlak, besiyeri yüzeyinden hafif kabarık fakat ortası çökük görünümdeki katalaz olumsuz koloniler incelemeye alındı. Pnömonokları diğer alfa hemolitik streptokoklardan ayırt etmek için optokin duyarlılık deneyi ve %2'lik safra tuzunda koloni eritme deneyi yapıldı (54).

3.1.3. Optokin Duyarlılık Deneyi

Optokin duyarlılık deneyi, *S. pneumoniae*'nin diğer alfa hemolitik streptokoklardan farklı olarak optokinin belirli yoğunluklarından etkilenerek erimesi temeline dayanır (54). Bu amaç için içerisinde 5 µg/ml optokin (etil-hidroakuprein hidroklorür) içeren kuru diskler kullanıldı (Bioanalyse®, Türkiye). Kanlı plakta üretilmiş kuşku bakterisi kolonilerinden öze ile alınarak yeni bir kanlı plağın yüzeyine yaygın ekim yapıldı. Plağın ortasına optokin diski yerleştirilerek 35°C ve %5'lik CO₂'li atmosfer ortamında 24 saat bekletildi. Optokinden etkilenen bakterilerde diskin etrafında oluşan üreme önlenim bölgesinin çapı ölçülerek değerlendirildi. Altı mm çapında disk kullanılarak önlenim bölgesi 14 mm ve daha büyük çapta olan suşlar optokine duyarlı, 6-14 mm arasında olanlar düşük duyarlı, 6 mm'den küçük çaptaki suşlar optokine dirençli sayıldı (54).

3.1.4. Safra Tuzunda Koloni Eritme Deneyi

Bu deney katı besiyerinde üremiş pnömonokok kuşku bakterisi koloninin üzerine safra tuzu eriyiği damlatılarak, koloninin eriyip erimeyemediğini araştırmak temeline dayanır (54). Ayrıca %2 sodyum deoksikolat (Becton Dickinson, Sparks, MD) olup, safra deneyi bunun %10'luk eriyiğinden 1 ml üzerine 4 ml saf su eklenerek elde edildi

(54). Kanlı plaktaki kuşkulu koloni üzerine küçük bir damla ayraç damlatıldı ve koloni alttan işaretlendi. Plak 35°C'de 30 dakika yüzü yukarı bakacak konumda inkübe edildi. Katı besiyerindeki *S. pneumoniae* kuşkulu kolonilerden bu süre sonunda dağılarak eriyenler pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

3.2.1 DNA Ekstraksiyonu

3.2.1.1. Proteinaz K-Fenol Yöntemi

Konvansiyonel PCR uygulaması öncesinde örneklerden proteinaz K-fenol yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla kanlı agar besiyerinde üremiş olan saf kolonilerden 8-10 koloni alınarak 1 ml beyin-kalp infüzyon besiyerinde (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri süspansiyonu 14 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı döküldü. Oluşan pellet 200 ml steril distile suyla süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyondan 60 µl alındı ve üzerine 15 µl Proteinaz K enzimi (20 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) eklendi. Bunların üzerine 250 µl K buffer eklendi ve 42°C'de ısı bloğunda bir saat bekletildi. Bu süre sonunda tüpe 1/1 oranındaki fenol/kloroform (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) karışımından 400 µl eklenip vortekslendi. Beş dakika 14 000 rpm'de çevirildi. Yeni temiz bir tüpe üst fazı alındı. Üzerine 500 µl izopropilalkol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) eklendi ve vortekslendi. Beş dakika 14 000 rpm'de çevirildi. Üst fazı döküldükten sonra tüpün dip kısmında kalan çökeltiye 500 µl % 70'lik etilalkol eklendi ve vortekslendi. Beş dakika 14 000 rpm'de çevirildi. Üstte kalan sıvı döküldü ve tüpteki alkolün buharlaşması için tüpler 10 dakika oda ısısında kapakları açık olarak bekletildi. Pelet 200 µl distile su ile süspanse edildi. Örnekler kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (55).

3.2.1.2. Spin Filtre Yöntemi

Real-time PCR uygulaması öncesinde üretici firmanın (RTP® Spin Bacteria DNA Mini Kit, Invitek, Almanya) önerisi doğrultusunda *S. pneumoniae* suşlarında etkene ait DNA'nın spin filtre yöntemiyle ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla içinde 1×10^9 cfu/ml bakteri olacak şekilde (Mc Farland Standart 3-4) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Pellet elde etmek için süspansiyon 14 000 rpm'de 7 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpteki sıvı tamamen boşaltıldı ve dipte kalan pellete 400 µl

Resüspansiyon Buffer R eklenerek karıştırıldı. Örnekler ekstraksiyon tüpüne transfer edildi ve kısaca vortekslendi. On dakika 65°C'deki ısı bloğunda bekletildi (56).

Sürenin bitiminde örnekler 95°C'de 5 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra örneğe 400 µl Binding Buffer B6 eklendi ve kısaca vortekslendi. Spin Filtreler 2 ml'lik tüplerin içine yerleştirildi. Örnek Spin Filtreye yüklendi ve bir dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 12 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün dibinde biriken filtrat boşaltıldı ve Spin Filtre tekrar 2 ml'lik tüplerin içine yerleştirildi. Örneğe 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 10 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün dibinde biriken filtrat boşaltıldı ve Spin Filter tekrar 2 ml'lik tüplerin içine yerleştirildikten sonra, örneğe 700 µl Wash Buffer II eklendi ve 10 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün dibinde biriken filtrat boşaltıldı ve Spin Filter tekrar 2 ml'lik tüplerin içine yerleştirildi. Tüplerdeki etanolü tamamen uzaklaştırmak için tüpler 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi (56).

Spin Filtreler yeni 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerinin içine kondu. Tüplere 200 µl Elution Buffer D eklendi. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildikten sonra 8 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen DNA ürünleri çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı (56).

3.2.2. Konvansiyonel PCR

3.2.2.1. Çoğaltma (Amplifikasyon) İşlemi

Çoğaltma işlemi öncesinde "temiz" PCR odasında buz üzerinde çoğaltma karışımı (master mix) hazırlandı. Bunun için bir tüp içerisine hasta başına;

Tampon PCR (10X)	4.5 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer 1 (50 pM)	0.5 µl
Primer 2 (50 pM)	0.5 µl
Taq polymerase (1.25 U)	0.25 µl
dd H ₂ O	10.25 µl
TOPLAM	20 µl

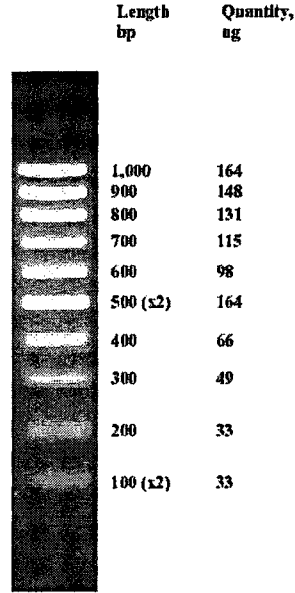
konarak bir reaktif hazırlandı. Bu miktarlar çalışılacak örnek sayısı kadar çoğaltılarak, her örnek için 20 µl olacak şekilde 0.5 ml'lik Eppendorf tüplerine dağıtıldı. Çoğaltma karışımının yüzeyi 100 µl mineral yağ ile kaplandı (56).

Çoğaltma karışımı konmuş tüplere ekstraksiyon odasında daha önce elde edilmiş olan DNA'dan 5 µl ilave edildi. Negatif kontrol tüpüne ekstraksiyon ürünü yerine "temiz" odada bulunan distile sudan 5 µl, pozitif kontrol tüpüne ise standart suştan (*S. pneumoniae* ATCC # 49619) ekstrakte edilmiş olan DNA'dan 5 µl ilave edildi. Daha sonra tüpler thermal cycler cihazına (Personel Cycler 20, Biometra, Almanya) yerleştirildi (56).

Thermal cycler cihazında amplifikasyon; ilk erime olarak 95°C'de 10 dakika, daha sonra denatürasyon-bağlanma-uzama aşamaları için sırasıyla 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1.5 dakika olmak üzere toplam 40 döngü tekrarlanarak gerçekleştirildi. Son uzama fazı 72°C'de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı ve amplifikasyon sonrası PCR ürünleri elektroforez aşamasına kadar +4°C'de tutuldu (56).

3.2.2.2. PCR Ürünlerinin İncelenmesi

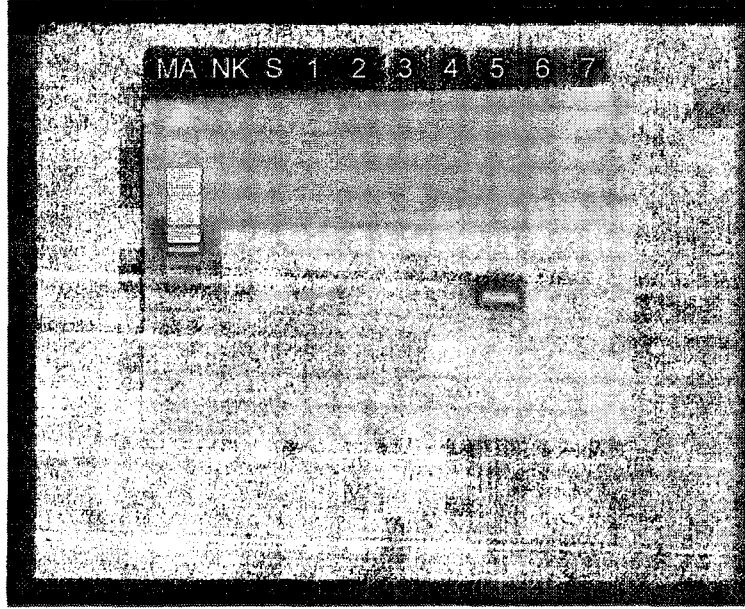
Çoğaltma işlemi sonrası elde edilen PCR ürünleri agaroz jele applike edildi. Bu amaçla hazırlanan % 1.5'luk agaroz (Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA) jel içine 0.1 µg/ml etidyum bromür (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) ilave edildikten sonra tarakların yerleştirilmiş olduğu jel tankına döküldü ve donması için bir süre bekletildi. Taraklar çıkartıldıktan sonra 5 µl PCR ürünü 3 µl yükleme tamponu (loading buffer) ile parafilm üzerinde karıştırıldı ve jelde açılmış kuyucuklara yerleştirildi. Ayrıca jele amplifiye olmuş ürünleri boylarına göre değerlendirmek amacıyla moleküler ağırlık markörü (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas Life Sciences, Ontario, Kanada) ilave edildi (Resim 3.1)(56).



Resim 3.1 . Moleküler ağırlık markörünün agaroz jeldeki görüntüsü (100bp).

Elektroforez tankı TBE tamponu (Tris-Borate-EDTA buffer) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) ile doldurulduktan sonra içerisine PCR ürünleri yüklenmiş olan jel yerleştirildi. Elektroforez işlemi 120-130 V akım verilerek 20-30 dakikada tamamlandı. Brom fenol mavisi ile boyanan bantların kuyucuklardan başlayarak negatif kutuptan pozitif kutba doğru yaklaşık 5 cm ilerlemesi elektroforezi durdurmak için yeterli sayıldı (56).

Oluşan bantlar jelin, jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Torcy, Fransa), ultraviyole (UV) ışığı altında izlenmesiyle ortaya çıktı. Her elektroforezde negatif ve pozitif kontrollere birlikte hasta örnekleri incelendi ve kamera (Video Graphic Printer, Sony, Almanya) ile görüntüleri alındı. Oluşan DNA bantlarının beklenen boyda olduğuna moleküler ağırlık markörünün bantları ile karşılaştırılarak karar verildi (Resim 3.2 (a) ve Resim 3.2 (b))(56).



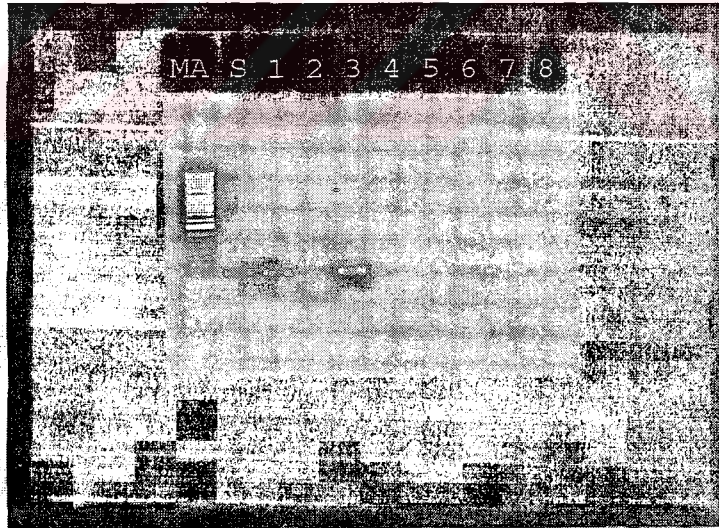
Resim 3.2 (a). Kültür pozitif hasta örneklerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

MA: Moleküler ağırlık markörü

NK: Negatif kontrol

S: Standart suş

1-7: Hasta rnekleri



Resim 3.2. (b) Kültür pozitif hasta örneklerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

MA: Moleküler ağırlık markörü

S: Standart suş

1-8: Hasta rnekleri

3.2.2.3. Konvansiyonel PCR’da Kullanılan Reaktifler

- **Proteinaz K** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

4 mg Proteinaz K, 10 ml TE (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) tamponu içinde çözülerek hazırlandı ve küçük völümlere bölünerek ve -20°C’de saklandı.

- **K Tamponu**

20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA ve % 0.2 lik SDS pH 8.0’a ayarlandıktan sonra karışıma 10 mg/ml olacak şekilde proteinaz K eklendi.

- **TBE Tamponu** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Kullanıma hazır olarak satın alındı.

- **Fenol** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

10 mM Tris HCl (pH 8.0) ile doymuş fenol sıvı halde kullanıma hazır olarak satın alındı.

- **Kloroform** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Moleküler biyolojik çalışma için hazırlanmış solüsyon kullanıldı.

- **İzopropil Alkol** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Moleküler biyolojik çalışma için hazırlanmış solüsyon kullanıldı.

- **%70’lik Etil Alkol**

Absolu etil alkol distile su ile % 70 konsantrasyona ayarlandı ve kullanıldı.

- **Tris HCl** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

1 M olacak şekilde gerekli miktarda Tris baz distile suda çözüldü ve pH’sı konsantre HCl ile 8.0’a ayarlandı.

- **Etilendiamintetraasetat (EDTA)** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Çözelti 0.5 M olarak kullanıma hazır alındı.

- **% 2 SDS (Sodyum Dodesil Sulfat)** (Böhringer Mannheim, GmbH, Almanya)

10 gr SDS 450 ml distile suya eklendi. İyice çözülmesi için 68°C’deki su banyosunda bekletildi. Sonra hacim 500 ml’ye tamamlandı. 1 N HCl eklenerek pH 7.2’ye ayarlandı. Kullanılana dek 4°C’de saklandı.

- **Etidyum bromür** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

Çalışmamızda 10 mg/ml olarak hazırlanmış solüsyonu kullanıldı. Etidyum bromürün buharlaşmasını engellemek için agaroz iyice çözüldükten sonra sıcaklık 55-60°C’ye gelince hazırlanan çözülden 0.1 µl/ml eklendi..

- **Brom fenol mavisi** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

40 mg brom fenol mavisi, 5 ml gliserol, 1.5 ml 0.5 M EDTA, 3.5 ml distile su ile total hacim 10 ml hazırlandıktan sonra Eppendorf tüplerine dağıtıldı ve 4°C'de saklandı.

- **Agaroz jel (% 1.5)** (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

0.6 gr agaroz, 40 ml TBE tamponu içerisinde eritilerek, 2-3 dakika süreyle kaynatıldı. Soğumaya bırakıldıktan sonra sıcaklığı 55-60°C'ye gelince etidyum bromür çözeltisinden 4 µl eklendi. İyi karıştırıldıktan sonra jel kalıbına dökülerek donması beklendi.

- **Primerler** (Metabion International AG, Martinsried, Almanya)

Çalışmamızda *S. pneumoniae*'nin *lytA* genine ait primer seti kullanıldı. PCR sonucunda elde edilen DNA dizisinin boyu 80 bp'dir. Primerler yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) sisteminde pürifiye edilmiş ve liyofilize şekilde satın alındı. İlk sulandırılmaları 100 pmol/µl olacak şekilde yapıldıktan sonra küçük hacimlere bölünerek ve -20°C'de saklandı.

Primer 1: 5'-ACG CAA TCT AGC AGA TGA AGC-3'

Primer 2: 5'-TGT TTG GTT GGT TAT TCG TGC-3'

- **PCR Tamponu (PCR Buffer 10X)** (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

PCR tamponu 100 mM Tris- HCl, 500 M KCl ve 25 mM MgCl₂ olacak şekilde hazırlanmış ve 10 kez konsantre edilmiş olarak satın alındı ve -20°C'de saklandı.

- **Deoksinükleotid miks (dNTP Mix)**(Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

Çalışmamızda her birinin konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde önceden hazırlanmış nükleotid karışımı kullanıldı ve -20°C'de saklandı.

- **Taq DNA Polimeraz** (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

Enzim 5U/µl olarak kullanıma hazır şekilde satın alındı ve -20°C'de saklandı.

- **Moleküler Ağırlık Markörü** (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas Life Sciences, Ontario, Kanada)

Elektroforez öncesi 5 µl moleküler ağırlık markörü alınarak agaroz jel üzerinde bulunan birinci kuyucuğa aplike edildi.

3.2.3. Real-Time PCR

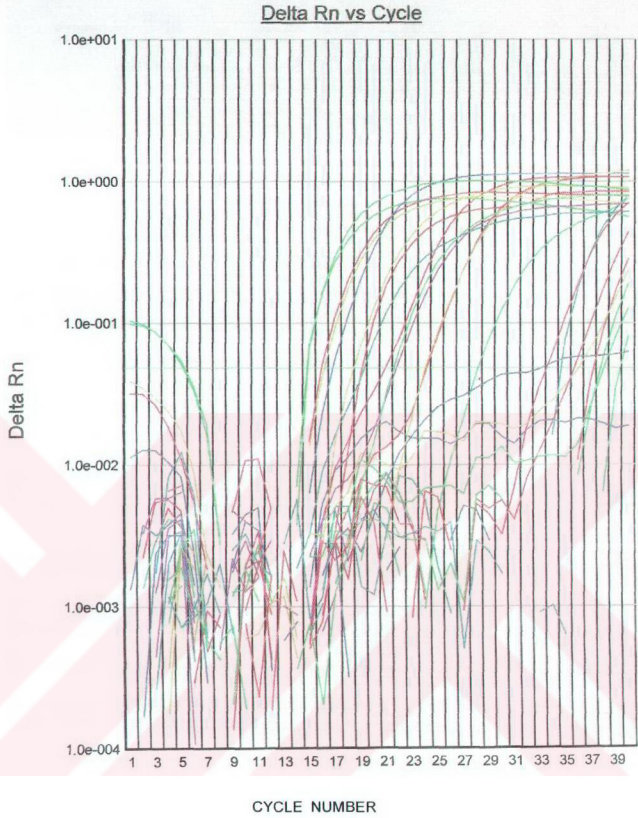
Real-time (gerçek zamanlı) PCR yönteminde pnömokoklar, RoboGene *S. pneumoniae* Detection Kiti (Roboscreen, Leipzig, Almanya) ve önceden ekstrakte

ettiğimiz DNA örnekleri kullanılarak tanımlandı. Örneklerin amplifikasyonu için; 5 µl 10X TaqMan Buffer, 10 µl 25mM MgCl₂, 10mM deoksiniükleotid trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), 0.5 µl 1U/µl'lik Amp Erase Urasil N-glycosylase ve 0.25 µl 5U/µl'lik Taq Gold Polimeraz enzimi içeren reaksiyon karışımından hasta başına 23.5µl, forward primerden (10 pmol) 0.5 µl , reverse primerden (10 pmol) 0.5 µl ve Taq Man Prob'dan (5 pmol) 0.5 µl eklenerek toplam 20 µl'lik bir reaksiyon karışımı temiz odada hazırlandı ve kapiller tüplere dağıtıldı. Üzerine ekstrakte edilmiş DNA'dan 5 µl kondu. Her çalışmada kit ile birlikte verilen pozitif ve negatif kontrollerle birlikte, standart suştan (*S. pneumoniae* ATCC # 49619) ekstrakte edilmiş olan DNA örneği de çoğaltıldı.

Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler ile florokrom boya ile işaretlenmiş proplar, *S. pneumoniae*'nin pnömölizin (ply) gen bölgesinden Primer Express Software (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, California, ABD) tarafından tasarlandı. Forward primer 5'-AGCGATAGCTTTCTCCAAGTGG-3' (pozisyon 531-552), revers primer 5'-CTTAGCCAACAAATCGTTTACCG-3' (pozisyon 605-583) nükleotid dizilerini içeriyordu. Pnömölizin gen bölgesine spesifik florokrom boya ile işaretli probun nükleotid dizisi 5'-ACCCCAGCAATTCAAGTGTTTCGCG-3' (pozisyon 556-580) olup, probun 5' ucundaki raportör boya 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' ucundaki baskılayıcı boya ise 6-carboxy-N, N, N', N'-tetramethyl rhodamine (TAMRA) idi (10).

Örneklerin amplifikasyonunda ABI 7000 Real-time PCR cihazı (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, California, ABD) kullanıldı. Kullanılan amplifikasyon protokolü 2 basamaklı olup; birinci basamak 95°C'de 10 dakikalık denatürasyon, ikinci basamak 40 döngülük 95°C'de 30 saniye ve 60°C'de 1.5 dakika süreli bağlanma ve uzama aşamalarından oluşuyordu (10).

Real-time PCR'da sonuçlar, oluşan floresan ışımının cihaz tarafından tespit edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Çalışmada her pozitif reaksiyon için bir döngü eşik değeri (cycle treshold = C_T) hesaplandı. Bu değer, ölçülen floresan sinyalin önceden hesaplanmış bir eşik değeri aşmasıyla hedef dizinin amplifikasyonunun gerçekleştiği PCR döngü sayısını işaret eder ve örnekte bulunan hedef DNA miktarını yansıtır. Amplifikasyon süresi boyunca (40 döngü) floresan ışımada artış gözlenmeyen örnekler negatif olarak kabul edildi (Resim 3.3)(10).



Resim 3.3. Kültür pozitif *S. pneumoniae* suşlarının real-time PCR 'daki amplifikasyon eğrileri.

BÖLÜM IV

BULGULAR

Çalışmamızda 180 adet alt solunum yolu örneği toplanarak incelemeye alındı. Toplanan örneklerin 139'u (% 77.2) balgam, 16'sı (% 8.9) bronşiyal aspirasyon sıvısı, 16'sı (% 8.9) trakeal aspirasyon sıvısı ve 9'u (%5) plevra sıvısı idi.

Çalışılan klinik örneklerin tamamı 18-68 (ort. 43) yaş grubundaki kişilerden alınmış olup, % 46.6'sı erkek, % 53.3'ü kadın hastalardan elde edilmiştir. Örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.

Klinik örnekler		Balgam	Bronşiyal aspirasyon sıvısı	Trakeal aspirasyon sıvısı	Plevra sıvısı
Yaş	Cinsiyet				
18-34 Y	Kadın	11	2	1	-
	Erkek	12	1	2	-
35-54 Y	Kadın	21	3	3	-
	Erkek	25	5	3	2
55-68 Y	Kadın	45	3	4	5
	Erkek	25	2	3	2
Toplam		139	16	16	9

Kültür yapılan 139 balgam örneğinden 91'inde (% 65.5), 16 bronşiyal aspirasyon sıvısı örneğinden 3'ünde (% 18.7), 16 trakeal aspirasyon sıvısı örneğinden 6'sında (% 37.5), 9 plevra sıvısı örneğinden 4'ünde (% 44.5) alfa hemoliz ile birlikte pnömokokların tipik koloni morfolojisini gösteren suşlar kültür pozitif kabul edilerek çalışmaya alındı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta örneklerinin kültür sonuçlarına göre dağılımı.

Klinik örnekler	Kültür pozitif		Kültür negatif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Balgam	91	65.5	48	34.5	139	100
Bronşiyal aspirasyon sıvısı	3	18.7	13	81.3	16	100
Trakeal aspirasyon sıvısı	6	37.5	10	62.5	16	100
Plevra sıvısı	4	44.5	5	55.5	9	100
Toplam	104	57.8	76	42.2	180	100

Kültür pozitif olan bu suşlara optokin duyarlılık testi ve safrada erime deneyi yapıldı. Optokin testi yapılan 104 klinik izolatin 65'inin (% 62.5) inhibisyon zon çapı ≥ 14 mm idi ve bu suşlar optokine duyarlı olarak kabul edildi. Zon çapı 6-14 mm arasında olan 12 (% 11.5) suş optokine düşük derecede duyarlı, zon çapı 6 mm'den küçük olan 27 (% 26) suş optokine dirençli olarak bulundu. Balgam örneklerinde kültür pozitif 91 izolatin 52'si (% 57) optokine duyarlı bulundu. Optokine düşük derecede duyarlı ve dirençli suşların tümü balgam örnekleri içinde yer almaktaydı. Bronşiyal aspirasyon sıvısı, trakeal aspirasyon sıvısı ve plevra sıvısı örneklerinden kültür pozitif suşların tamamı optokine duyarlı bulunurken, bu üç grupta optokine düşük duyarlı ya da dirençli suş tespit edilmedi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kültür pozitif örneklerin optokine duyarlılık sonuçlarına göre dağılımı.

Klinik örnekler	Optokin Duyarlılığı						Toplam	
	≥ 14 mm		6-14 mm		< 6 mm			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Balgam	52	57	12	13	27	30	91	100
Bronşiyal aspirasyon sıvısı	3	100	–	–	–	–	3	100
Trakeal aspirasyon sıvısı	6	100	–	–	–	–	6	100
Plevra sıvısı	4	100	–	–	–	–	4	100
Toplam	65	62.5	12	11.5	27	26	104	100

Safrada erime deneyi yapılan 104 klinik izolatin 73'ünde (% 70.2) besiyerindeki pnömokok kolonilerinin eridiği gözlenirken, 31'inde (% 29.8) test sonucu negatif olarak bulundu. Kültür pozitif 91 adet balgam örneğinin 60'ının (% 66) safrada erime deneyi pozitif, 31'inin (% 34) negatif bulundu. Bronşiyal aspirasyon sıvısı, trakeal aspirasyon sıvısı ve plevra sıvısı örneklerinden kültür pozitif suşların tamamının safrada erime deneyi pozitif idi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kültür pozitif örneklerin safrada erime deneyi sonuçlarına göre dağılımı.

Klinik örnekler	Safrada Erime Deneyi				Toplam	
	Pozitif		Negatif			
	n	%	n	%	n	%
Balgam	60	66	31	34	91	100
Bronşiyal aspirasyon sıvısı	3	100	–	–	3	100
Trakeal aspirasyon sıvısı	6	100	–	–	6	100
Plevra sıvısı	4	100	–	–	4	100
Toplam	73	70.2	31	29.8	104	100

Optokine duyarlı bulunan 65 suşun tamamında safrada erime deneyi pozitif idi. Optokine düşük derecede duyarlı olan 12 izolatin 8'inde (% 66.7) safrada erime deneyi pozitif bulunurken, 4'ünde (% 33.3) negatif olarak bulundu. Optokine dirençli olan 27 izolatin tamamında safrada erime deneyi negatif olarak bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kültür pozitif suşların optokine duyarlılık ve safrada erime deneyi sonuçlarına göre dağılımı.

Optokine Duyarlılık	Safrada Erime Deneyi				Toplam	
	Pozitif		Negatif			
	n	%	n	%	n	%
Optokine duyarlı	65	100	–	–	65	100
Optokine düşük duyarlı	8	66.7	4	33.3	12	100
Optokine dirençli	–	–	27	100	27	100
Toplam	73	70.2	31	29.8	104	100

Kültür pozitif suşların moleküler yöntemlerle tanısında sırasıyla konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri kullanıldı. Konvansiyonel PCR’da kültür pozitif 91 balgam örneğinin 55’i (% 60.4) pozitif, 36’sı (% 39.6) negatif, plevra sıvısı örneklerinin 3’ü (% 75) pozitif, 1’i (% 25) negatif bulundu. Bronşiyal aspirasyon sıvısı ve trakeal aspirasyon sıvısı örneklerinden kültür pozitif olanların tamamı konvansiyonel PCR’la pozitif bulundu. (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kültür pozitif örneklerin konvansiyonel PCR sonuçlarına göre dağılımı.

Klinik örnekler	Konvansiyonel PCR				Toplam	
	Pozitif		Negatif		N	%
	n	%	n	%		
Balgam	55	60.4	36	39.6	91	100
Bronşiyal aspirasyon sıvısı	3	100	–	–	3	100
Trakeal aspirasyon sıvısı	6	100	–	–	6	100
Plevra sıvısı	3	75	1	25	4	100
Toplam	67	64.4	37	35.6	104	100

Real-time PCR’da kültür pozitif 91 balgam örneğinin 61’i (% 67) pozitif, 30’u (% 33) negatif, plevra sıvısı örneklerinin 3’ü (% 75) pozitif, 1’i (% 25) negatif bulundu. Bronşiyal aspirasyon sıvısı ve trakeal aspirasyon sıvısı örneklerinden kültür pozitif olanların tamamı real-time PCR’la pozitif bulundu (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kültür pozitif örneklerin real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı.

Klinik örnekler	Real-time PCR				Toplam	
	Pozitif		Negatif		n	%
	n	%	n	%		
Balgam	61	67	30	33	91	100
Bronşiyal aspirasyon sıvısı	3	100	–	–	3	100
Trakeal aspirasyon sıvısı	6	100	–	–	6	100
Plevra sıvısı	3	75	1	25	4	100
Toplam	73	70.2	31	29.8	104	100

Çalışmamızda alt solunum yollarına ait kültür pozitif örneklerden soyutlanan 104 pnömokok suşundan 67'si (% 64.4) hem konvansiyonel PCR, hem de real-time PCR yöntemleri ile pozitif bulunurken, 31 (% 29.8) suş her iki yöntemle de negatif bulundu. Altı (% 5.8) suş konvansiyonel PCR ile negatif, real-time PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Kültür pozitif suşların konvansiyonel PCR ve real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı.

Moleküler tanı	Konvansiyonel PCR (+)		Konvansiyonel PCR (-)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Real-time PCR(+)	67	64.4	6	5.8	73	70.2
Real-time PCR(-)	-	-	31	29.8	31	29.8
Toplam	67	64.4	37	35.6	104	100

Streptococcus pneumoniae'nin klasik tanı yöntemleri ile real-time PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda; 71 (% 68.2) suş her iki yöntemle de pozitif bulunurken, iki (% 2) suş klasik yöntemle pozitif, real-time PCR ile negatif bulunmuştur. Hem klasik yöntemle hem de real-time PCR ile negatif olarak saptanan suşların sayısı 31'dir (% 29.8) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Kültür pozitif suşların klasik yöntemler (optokin ve safrada erime deneyi) ve real-time PCR sonuçlarına göre dağılımı.

Klasik Yöntem	Pozitif		Negatif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Real-time PCR (+)	71	68.2	-	-	71	68.2
Real-time PCR (-)	2	2	31	29.8	33	31.8
Toplam	73	70.2	31	29.8	104	100

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Bağımlı Gruplarda İki Yüzde Arasındaki Farkın Önemlilik Testi ile değerlendirildi.

Streptococcus pneumoniae'yi diğer alfa hemolitik streptokoklardan ayırt etmek amacıyla en sık kullanılan klasik yöntemlerden olan optokine duyarlılık testi

ve safrada erime deneyi arasında, testlerin sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($t = 0.060$, $SD = 102$, $p > 0.05$). Optokin deneyinin duyarlılığı % 100, seçiciliği % 87 ve güvenilirliği % 96 olarak bulundu.

Kültür pozitif suşlara uygulanan konvansiyonel PCR ile real-time PCR yöntemleri arasında pnömokokların identifikasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığına karar verildi ($t = 0.77$, $SD = 102$, $p > 0.05$). Real-time PCR'ın duyarlılığı % 100 seçiciliği % 83.8 ve güvenilirliği % 94 olarak bulundu.

Streptococcus pneumoniae'nin identifikasyonunda klasik yöntemlerle real-time PCR yöntemi arasında duyarlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığına karar verildi ($t = 1.44$, $SD = 102$, $p > 0.05$). Real-time PCR'ın klasik yöntemlere göre duyarlılığı % 97, seçiciliği % 100 ve güvenilirliği % 98 olarak bulundu.



BÖLÜM V

TARTIŞMA

Streptococcus pneumoniae, kullanılan korunma yöntemlerine ve antimikrobiyal ajanlardaki gelişmelere rağmen, halen tüm dünyada önemli oranda morbidite ve mortaliteye neden olan bir infeksiyon etkenidir. Çocuklarda ve erişkinlerde solunum yolu infeksiyonlarının yanı sıra menenjit, sepsis, endokardit gibi ciddi invaziv infeksiyonlara da yol açabilmektedir (21).

Pnömonokoklar geçmişte akut toplum kökenli pnömonilerin % 50-90'ından sorumlu tutulmakta idi. Son zamanlarda ise toplum kökenli pnömonilerin % 16-60'ından sorumlu tutulmakta ve hala toplum kökenli pnömonilerin birinci nedeni olmaya devam etmektedir (17). *Streptococcus pneumoniae*, toplum kökenli pnömoniler ile ilgili yapılan çalışmaların hemen hepsinde en yaygın etiyolojik ajan olarak bulunmuş ve bütün bakteriyel pnömonilerin üçte ikisinden sorumlu tutulmuştur (57).

İspanya'da yapılan bir çalışmada klinik olarak toplum kökenli pnömoni tanısı konulan 184 hastadan alınan örnekler mikrobiyolojik olarak incelenmiş ve 44 (% 23.9) hastada *S. pneumoniae* etken olarak tespit edilmiştir (58). Ewig ve ark. (59) toplum kökenli pnömoni etkenlerini araştırdıkları çalışmalarında hastaların % 33'ünde etkenin *S. pneumoniae* olduğunu tespit etmişler, ancak olguların çoğunda bir patojen saptanamadığını bildirmişlerdir.

Schneeberger ve ark. (60) yakın zamanda yaptıkları çalışmada toplum kökenli pnömoni tanısı alan olguların % 33'ünde etkenin *S. pneumoniae* olduğunu tespit etmişlerdir. Küçükardalı ve ark. (61) ise yaşlı popülasyonda (> 65 yaş) olguların % 31.7'sinde bakteriyolojik tanı konulabildiğini ve en sık izole edilen etkenin *S. pneumoniae* olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, toplum kökenli pnömoni tanısı konmuş hastalardan alınan 180 adet alt solunum yolu örneğinin moleküler yöntemlerle incelenmesi sonucunda 67 (% 37.2) örnekte *S. pneumoniae* izole edilmiştir. Bu bulgu literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir.

Toplum kökenli pnömoni tanısında mikrobiyolojik etkenin araştırılması için incelenen klinik örnekler; balgam, trakeal aspirasyon sıvısı, bronkoalveolar aspirasyon sıvısı ve plevral sıvı örnekleridir (62). Kan kültürü örnekleri de tanıda sıklıkla başvurulmasına karşın, etkenin izolasyonunda duyarlı değildir ve olguların sadece üçte birinde pozitif sonuç vermektedir (63, 64).

Balgamın mikroskopik olarak incelenmesi ve kültürü, toplum kökenli pnömoni etkeni olan pnömokokların saptanmasında önemlidir. Musher ve ark. (65) yaptıkları çalışmada balgamın Gram boyamasının ve kültürünün duyarlılığını sırasıyla % 57 ve % 79 olarak bulmuşlardır. Toplum Kökenli Pnömoni Tanı ve Tedavi rehberinde, balgam kültürlerinin pnömokoklar yönünden duyarlılığının yaklaşık % 50 olduğu belirtilmiştir (63). Bu çalışmada toplanan balgam örneklerinde pnömokokların izolasyon sıklığı % 43.2'dir. Pnömokokların nazofarenksteki kolonizasyonları da dikkate alındığında, elde edilen bu oranın önemli ölçüde pnömoni etkenlerini yansıttığı söylenebilir.

Bronşiyal aspirasyon sıvısı ve trakeal aspirasyon sıvısı gibi balgam dışı örneklerde pnömokokların izolasyonu balgama göre daha düşük sıklıkta bulunmuş (% 18.7 ve % 37.5), fakat bu örneklerde kültür pozitif olguların tamamı pnömokok olarak tanımlanmıştır. Bu bulgu, balgam gibi normal flora elemanlarının bulunabileceği klinik örneklerde etkenin izolasyon oranının azaldığını, steril şartlarda alınan solunum yolu örneklerinde ise etkenin izolasyon şansının arttığını göstermiştir. Çalışmada pnömokokların izolasyonu en sık plevral sıvı örneklerinden yapılmıştır (% 44.5). Plevral sıvının akciğer parankimine olan yakın komşuluğu, bu örnekleri etkenin tanımlanmasında değerli kılmaktadır.

Streptococcus pneumoniae'nin klasik yöntemlerle identifikasyonunda optokine duyarlılık testi, safrada erime deneyi ve kapsül şişme reaksiyonu kullanılmaktadır. Optokine duyarlılık testi ve safrada erime deneyi uygulaması kolay ve ucuz oldukları için tercih edilen, kapsül şişme deneyi ise zor ve pahalı bir yöntem olduğu için çok tercih edilmeyen yöntemlerdir. *Streptococcus pneumoniae*'nin identifikasyonunda optokin testinin ve safrada erime deneyinin duyarlılık ve seçicilikleri oldukça yüksektir ve sonuçlar birbiriyle paralellik göstermektedir. Chandler ve ark. (66), referans metod olarak DNA prob yöntemini kullandıkları çalışmalarında tipik koloni morfolojisi gösteren suşlarda optokin testinin duyarlılık ve seçiciliğini % 100, safrada erime deneyinin duyarlılığını % 80, seçiciliğini ise % 100 bulmuşlardır. Bu çalışmada moleküler yöntemlere göre optokin testinin

duyarlılığı ve seçiciliği sırasıyla % 100 ve % 81.8, safrada erime deneyinin duyarlılığı % 100, seçiciliği % 94 olarak bulunmuştur.

Optokin deneyinin kullanılan besiyeri ve inkübasyon şartlarından etkilendiği bilinmektedir (67). Optokine düşük duyarlı bulunan pnömokok suşlarında tanıyı doğrulamak için safrada erime testi yapılması önerilmektedir (54). Çalışmamızda optokine düşük derecede duyarlı (zon çapları: 8-12 mm) bulunan 12 adet alfa hemolitik suşa yapılan safrada erime deneyinde 8 (% 66.7) suş pozitif, 4 (% 33.3) suş ise negatif bulunmuştur. Safrada erime deneyi pozitif olan bu (optokine düşük duyarlı) 8 suş pnömokok olarak değerlendirilmiştir. Bu konuda yapılan bir çalışmada safrada erime deneyi pozitif olgularda tanıyı doğrulamak için başka teste gerek olmadığı, ancak negatif olgularda tanıyı doğrulamak için başka testler yapılması gerektiği bildirilmektedir (66).

Pnömokokal pnömoninin mikrobiyolojik olarak kesin tanısının klasik yöntemlerle konamadığı günümüzde kabul edilen bir olgudur (68). Bu nedenle pnömonili hastalarda kesin mikrobiyolojik tanının konması için yeni yöntemler geliştirilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu gibi moleküler tanı yöntemleri ile yapılan çalışmalar, bu yöntemlerin örnekte bulunan çok küçük miktardaki mikroorganizmaların bile hızlı bir şekilde saptanmasını sağlayan, seçiciliği yüksek yöntemler olduğunu göstermektedir (69, 70).

Streptococcus pneumoniae'nin konvansiyonel PCR ile identifikasyonu konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır (5, 6, 58, 59, 68, 71-74). Genel olarak bu yöntem kültürden daha duyarlı olarak kabul edilmektedir (73). PCR yönteminin erken sonuç vermek, antibiyotik tedavisinden etkilenmemek ve örneğin yıllarca saklandıktan sonra bile yeniden çalışılabilir olması (sonuçların tekrarlanabilirliği) gibi avantajları vardır. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle değişik vücut sıvı ve sekresyonlarında *S. pneumoniae* DNA'sı saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kan (5, 49, 65, 75), serum (6, 11), serebrospinal sıvı (8, 76), orta kulak sıvısı (77), nazofarengeal salgı (58, 73, 78), idrar (73), balgam, bronşiyal aspirasyon sıvısı, trakeal aspirasyon sıvısı (60, 73, 79) ve plevral sıvı (80) kullanılmıştır.

Murdoch ve ark (73) toplum kökenli pnömonili yetişkin hastalarda respiratuar ve nonrespiratuar örnekler ile araştırma yapmışlar, klasik kültür yöntemi ile PCR yöntemini karşılaştırmışlar; PCR ile yüksek oranda mikroorganizma saptandığını, ancak PCR yönteminin kolonizasyonu infeksiyondan ayırmada yetersiz kaldığını

bildirmişlerdir. Lorente ve ark (68) klinik olarak toplum kökenli pnömoni tanısı almış hastalardan kan örnekleri olarak PCR yöntemi ile araştırma yapmışlar ve PCR'in duyarlılığını % 55, seçiciliğini ise % 100 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada klasik tanı yöntemleriyle tanımlanan pnömokokların % 64.4'ü konvansiyonel PCR ile pozitif bulunurken, % 35.6'sı negatif bulunmuştur.

Real-time PCR, *S. pneumoniae*'nin tanısında yakın zamanda kullanıma girmiş bir yöntemdir. Kearns ve ark (8), 12 serebrospinal sıvı örneğinde pnömokok tanısı için real-time PCR yöntemini kullanmışlar ve kültür pozitif örneklerin tümünün real-time PCR ile pozitif bulunduğunu, ayrıca hem lateks aglutinasyon hem de kültür ile negatif 3 örneğin de aynı yöntemle pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Corless ve ark. (9) yaptıkları çalışmada menenjit ve septisemi şüphesi olan hastalarda real-time PCR ile *N. meningitidis* ve *H. influenzae* ile birlikte *S. pneumoniae* 'yi araştırmışlar, kültür pozitif çeşitli klinik örneklerde (serebrospinal sıvı, serum, plazma, tam kan) real-time PCR'in *S. pneumoniae* için duyarlılığını % 91.8 olarak bulmuşlardır. Yazarlar ayrıca bu araştırmalarında kültür negatif örneklerde % 1.1 oranında pnömokok pozitif sonuç elde etmişlerdir. Greiner ve ark. (10) çalışmalarında real-time PCR yöntemi ile nazofarengeal sekresyonlarda pnömokokları araştırmışlar, TaqMan probu ve pnömolizin geni (*ply*) için spesifik primerler kullanarak duyarlılık ve seçicilik oranlarını sırasıyla % 100 ve % 96 olarak bulmuşlardır. McAvin ve ark. (11) çalışmalarında TaqMan probu ile otolizin genini (*lytA*) primer olarak kullanmışlar ve 70 adet kültür pozitif örnek ile 26 adet kültür negatif örnekte real-time PCR ile kültür sonuçlarının tümünün uyumlu bulunduğu bildirilmişlerdir.

Çalışmamızda *S. pneumoniae* 'nin pnömolizin gen bölgesine özgül primer seti ve TaqMan probu kullanılarak gerçekleştirilen real-time PCR yönteminde, klasik yöntemlerle pnömokok olarak tanımlanan 73 örnekten 71'i (% 97.3) pozitif, 2'si (% 2.7) ise negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre real-time PCR yönteminin duyarlılığı % 97, seçiciliği % 100 ve güvenilirliği % 98'dir.

Literatürde *S. pneumoniae*'nin identifikasyonunda hem konvansiyonel, hem de real-time PCR yöntemleri ile iyi sonuçlar alındığına dair çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, pnömokokların tanısında bu iki yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda kültür pozitif 104 örnekten 67'si (% 64.4) her iki moleküler tanı yöntemiyle de pozitif bulunmuştur. Konvansiyonel PCR'dan elde edilen pozitif sonuçların tamamı real-time PCR ile pozitif bulunmuş, ancak konvansiyonel PCR ile pnömokok saptanamayan 6 (%5.8) örnekte real-time PCR ile

pozitif sonuç elde edilmiştir. Bulgularımız *S. pneumoniae*'nin saptanmasında real-time PCR yönteminin konvansiyonel PCR'a göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, hızlı ve kantitatif gen analizi, mikrobiyolojide ve klinikte infeksiyon hastalıklarının tanısında çok önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde real-time PCR sistemleri, infeksiyon etkeni araştırması ve gerçek kantitasyonu, genetik mutasyonlar ve dizi polimorfizmleri saptanmasında kullanılmakta, ilaç direnci, konak immunitesi ve mikroorganizma patogenezeine yönelik etkin araştırma olanakları sunmaktadır. Bununla birlikte özellikle kültürde üretilmesi zor olmayan bakterilerin identifikasyonunda, PCR ve diğer moleküler yöntemler yanında, konvansiyonel metodlar (kültür, mikroskopi, kimyasal testler) vazgeçilmezliğini korumaktadır. Bulgularımız doğrultusunda, *S. pneumoniae*'nin saptanmasında konvansiyonel PCR ve real-time PCR'ın yöntemlerinin diğer klasik tanı yöntemlerinden (kültür, optokine duyarlılık testi, safrada erime deneyi) daha duyarlı olduğu, real-time PCR yönteminin ise konvansiyonel PCR yöntemine oranla daha duyarlı olduğu kanısına varıldı.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

1. Toplum kökenli pnömoninin etiyolojisinde *S. pneumoniae* birinci sırada yer almaktadır.
2. *Streptococcus pneumoniae* tanısında Gram boyaması, kültür, optokine duyarlılık testi, safrada erime deneyi ve moleküler yöntemler kullanılabilir.
3. Konvansiyonel PCR ve real-time PCR *S. pneumoniae* identifikasyonunda kullanılabilen, duyarlılığı ve seçiciliği yüksek yöntemlerdir.
4. *Streptococcus pneumoniae* identifikasyonunda moleküler tanı yöntemleri klasik tanı yöntemlerinden daha duyarlı ve daha seçicidir.
5. Real-time PCR yönteminin duyarlılık ve seçiciliği konvansiyonel PCR yönteminden daha yüksektir.
6. Real-time PCR yöntemi toplum kökenli pnömonilerin en sık etkeni olan *S. pneumoniae*'nin erken ve hızlı tanısında güvenle kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol Rev. 1995; 59: 591-603.
2. Obaro SK, Monteil MA, Henderson DC The pneumococcal problem. BMJ. 1996; 312: 1521-5.
3. Perkins MD, Mirrett S, Reller LB Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1486-91.
4. Nohynek H, Eskola J, Kleemola M, Jalonen E, Saikku P, Leinonen M Bacterial antibody assays in the diagnosis of acute lower respiratory tract infection in children. Pediatr Infect Dis J. 1995; 14: 478-84.
5. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2661-6.
6. Salo P, Ortqvist A, Leinonen M Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. J Infect Dis. 1995; 171: 479-82.
7. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques. 1997; 22: 176-81.
8. Kearns AM, Freeman R, Murphy OM, Seiders PR, Steward M, Wheeler J. Rapid PCR-based detection of Streptococcus pneumoniae DNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3434.

9. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1553-8.
10. 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: 3129-34.
11. McAvlin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, Beninga KK, Astorga A, McCleskey FK, Huff WB, Niemeyer D, Lohman KL. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3446-51.
12. Bilgehan H. Gram olumlu koklar. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları.* İzmir, Barış Yayınları, 2000: 271-316.
13. Cengiz AT. *Streptococcus pneumoniae*. Ustaçelebi Ş (Ed), *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara, Güneş Kitabevi, 1999: 365-371.
14. Gülay Z. *Streptococcus pneumoniae*: Mikrobiyolojik özellikleri, virulans ve epidemiyoloji. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, 2004: 157-161.
15. Öncül O. *Streptococcus pneumoniae*. Dündar İH (Ed) In: *Current İnfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi.* İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2004: 489-501.
16. Sümerkan B. *Streptococcus pneumoniae*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.(Eds) In: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* Nobel Tıp Kitabevleri. 2002: 1493-1497.
17. Donowitz GR, Mandel GL: *Acut pneumoniae*. Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). In: *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Fifth Edition. New York, Churchill Livingstone. 2000: 717-742.

18. Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal infection. N Engl J Med. 1995; 332: 1280-4.
19. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2759-62.
20. Eraksoy H Bakteriyel Pnömoniler Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds) In: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2002: 522-528.
21. Musher DM: *Streptococcus pneumoniae*. Mandel GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition. New York, Churchill Livingstone. 2000: 2128-47.
22. Raman AS, Swinburne AJ, Fedullo AJ. Pneumococcal adherence to the buccal epithelial cells of cigarette smokers. Chest. 1983; 83: 23-7.
23. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Fourth edition. Philadelphia. Lippincott Company. 1992. 431-466.
24. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin Infect Dis. 1992; 14: 801-7.
25. Shanahan, James F. (Ed) Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed., Mosby, California, 1994: 343-344.
26. Marcos MA, Jimenez de Anta MT, de la Bellacasa JP, Gonzalez J, Martinez E, Garcia E, Mensa J, de Roux A, Torres. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. Eur Respir J. 2003; 21: 209-14.

27. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 596-601.
28. Jacobs MR. Treatment and diagnosis of infections caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 119-27.
29. Klein DL. Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. *Microb Drug Resist.* 1995; 1: 49-58.
30. Klein DL, Eskola J. Development and testing of *Streptococcus pneumoniae* conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect.* 1999; 5(Suppl 4): S17-S28.
31. Ece T, Arman D, Akalın H, Alataş F, Biberoglu K, Çakar N, Çakır N, Çalangu S, Çalışır H.C, Ellidokuz H, Gülay Z, Günerli A, Karabey S, Kılınc O, Korten V, Osma E, Özkan M, Özsüt H, Uçan E.S, Ulusoy S, Usluer G, Vahaboğlu H. Toraks Derneği Erişkinlerde Hastane Kökenli Pnömoni Tanı ve Tedavi Rehberi 2002. *Toraks Dergisi.* 2002; 3 (Ek): 001-013.
32. Ulusoy S, Arda B. Dirençli pnömokok ve enterokok infeksiyonları ve sağaltımı. Yüce A, Çakır N (eds). *Hastane infeksiyonları.* İzmir, Güven Kitabevi, 2003, 55-65.
33. Ruiz M, Ewig S, Torres A, Arancibia F, Marco F, Mensa J, Sanchez M, Martinez JA. Severe community-acquired pneumonia. Risk factors and follow-up epidemiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 923-9.
34. Bates JH, Campbell GD, Barron AL, McCracken GA, Morgan PN, Moses EB, Davis CM. Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. *Chest.* 1992; 101: 1005-12.
35. Özlü T. Toplum kökenli tipik pnömoniler. *Sendrom* 1996; 8: 41-46.

36. Erelel M, Aydın D, Kıyan E, Çuhadarođlu Ç, Arseven O, Tabak I. Atipik pnömoni ve dual etyoloji. *Klimik Dergisi* 2000; 13: 46-49.
37. Skerrett SJ. Host defenses against respiratory infection. *Med Clin North Am.* 1994, 78: 941-66.
38. Satir P, Sleight MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:137-55.
39. Sleight MA. Ciliary function in transport of mucus. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1983;128 (Pt 1):287-92.
40. Quie PG. Lung defense against infection. *J Pediatr.* 1986; 108: 813-6.
41. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology.* Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 7-10.
42. Levinson W, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology: Examination and Board Review, 7th ed.,* New York, Appleton and Lange, 2002, 23-27.
43. Akalın H. Nozokomiyal pnömoni-I: Epidemiyoloji-patogenez-etyoloji-tanı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2004; 8:11-20.
44. Sahn SA. Management of complicated parapneumonic effusions. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 813-17.
45. Styr B. Infection associated with asplenia: risks, mechanisms, and prevention. *Am J Med.* 1990; 88:33-42.
46. Köksal F, Durmaz R (ed). 'Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji'. 2. Baskı. Adana, Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 15-24.

47. Jordan JA, Durso MB Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2574-78.
48. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. Durmaz R (ed). 'Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji'. 2. Baskı. Adana, Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 35-43.
49. Kearns AM, Wheeler J, Freeman R, Seiders PR, Perry J, Whatmore AM, Dowson CG. Pneumolysin detection identifies atypical isolates of Streptococcus pneumoniae. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1309-10.
50. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 1292-305.
51. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996; 6: 986-94.
52. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 1995; 4: 357-62.
53. Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2933-36.
54. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2002: 495-523.
55. Türkoğlu S, Badur S. Enfeksiyon Hastalıkları Tanısında PCR. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1995: 11-20.

56. RTP Spin Bacteria DNA Mini Kit For DNA extractions from bacteria from different kinds of starting materials. Invitex, Berlin, Almanya, 2004.
57. Fine MJ, Stone RA, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, Lave JR, Hough LJ, Obrosky DS, Schulz R, Ricci EM, Rogers JC, Kapoor WN. Processes and outcomes of care for patients with community-acquired pneumonia: results from the Pneumonia Patient Outcomes Research Team (PORT) cohort study. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 970-80.
58. Menendez R, Cordoba J, de La Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, Gobernado M. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 1868-73.
59. Ewig S, Torres A, Angeles Marcos M, Angrill J, Rano A, de Roux A, Mensa J, Martinez JA, de la Bellacasa JP, Bauer T. Factors associated with unknown aetiology in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J.* 2002; 20: 1254-62.
60. Schneeberger PM, Dorigo-Zetsma JW, van der Zee A, van Bon M, van Opstal JL. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36: 269-73.
61. Küçükardalı Y, Öncül O, Nalbant S, Çankır N, Top C, Ağdaş Ş, Şilt E, Danacı M. Yaşlı popülasyonda Toplum kökenli Pnömoni olguları .*Geriatri* 2001; 4: 62-66.
62. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM Jr, Musher DM, Fine MJ. Guidelines from the Infectious Diseases Society of America, Practice guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: 347-382.

63. Arseven O, Özlü T, Aydın G, Baytemür M, Bozkurt F, Doğanay M, Ekim N, Eraksoy H, Gür D, Hatipoğlu O.N, Leblebicioğlu H, Mülazımoğlu L, Özinel M.A, Savaş İ, Uçku R, Ünal S, Yenen O.Ş. Toraks Derneği Erişkinlerde Toplum Kökenli Pnömonilerde Tanı ve Tedavi Rehberi 2002. Torkas Dergisi 2002; 3 (ek 3): 1-15.
64. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1730-54.
65. Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis. 2004; 39: 165-9.
66. Chandler LJ, Reisner BS, Woods GL, Jafri AK. Comparison of four methods for identifying Streptococcus pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000; 37: 285-87.
67. Gardam MA, Miller MA. Optochin revisited: defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of Streptococcus pneumoniae. J Clin Microbiol. 1998; 36: 833-4.
68. Lorente ML, Falguera M, Nogues A, Gonzalez AR, Merino MT, Caballero MR. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. Thorax. 2000; 55: 133-7.
69. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 242-56.
70. Bayram A. Seropozitif ve seronegatif kişilerde Hepatit B virüs DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Doktora Tezi, Gaziantep, 2000.

71. Michelow IC, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins NK, Ghaffar F, Rodriguez-Cerrato V, Leinonen M, McCracken GH Jr. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: E1-11.
72. Isaacman DJ, Zhang Y, Reynolds EA, Ehrlich GD. Accuracy of a polymerase chain reaction-based assay for detection of pneumococcal bacteremia in children. *Pediatrics.* 1998; 101: 813-6.
73. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RT, Town GI, Mills GD, Chambers ST, Jennings LC. 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: 63-6.
74. Gillespie SH, Ullman C, Smith MD, Emery V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1308-11.
75. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1721-24.
76. van Haeften R, Palladino S, Kay I, Keil T, Heath C, Waterer GW. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47: 407-14.
77. Liederman EM, Post JC, Aul JJ, Sirko DA, White GJ, Buchman CA, Ehrlich GD. Analysis of adult otitis media: polymerase chain reaction versus culture for bacteria and viruses. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998; 107: 10-6.
78. Saukkoriipi A, Kaijalainen T, Kuisma L, Ojala A, Leinonen M. Isolation of pneumococcal DNA from nasopharyngeal samples for real-time, quantitative PCR : comparison of three methods. *Mol Diagn.* 2003; 7: 9-15.

79. Scott JA, Marston EL, Hall AJ, Marsh K. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by *psaA* PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2554-59.
80. Falguera M, Lopez A, Nogues A, Porcel JM, Rubio-Caballero M. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. *Chest.* 2002; 122: 2212-16.



ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Konya’da doğdu. İlköğrenimini Isparta’da tamamladı. Orta ve lise öğrenimini Akşehir’de tamamladı. 1995 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldu.

1995-2000 yılları arasında İstanbul’da özel sektörde çalıştı. Ocak 2000’de T.C. Sağlık Bakanlığı Gaziantep 75. Yıl Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi’nde kurum hekimi olarak çalışmaya başladı.

2001-2002 eğitim-öğretim yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. 6 Temmuz 2004 tarihinde doktora yeterlilik sınavını başarıyla geçerek tez çalışmalarına başladı.

İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.