

# *Mycoplasma pneumoniae* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Mine Anđ-Küçüker

## Giriş

Bakteri taksonomisinde *Tenericutes* bölümünün *Mollicutes* sınıfında yer alan (1) ve  $5 \times 10^8$  daltonluk genomlarıyla yapay besiyerlerinde üreyebilen en küçük mikroorganizma ünvanına sahip olan *Mycoplasma* cinsi bakteriler, evrim sürecinde hücre duvarı olmaksızın ve sınırlı biyosentetik etkinliklerle üreyebilme yeteneği gibi bazı özgül yaşama stratejileri geliştirmiş bir gruptur (1,2). Bu özellikler, bu bakterilerin muayene maddelerinde gösterilebilmesi, etken olarak tanımlanabilmeleri için özel yöntemleri zorunlu kılmaktadır (2).

Bu yazıda, laboratuvar tanısına ilişkin bilgilerin özelleneneği *M.pneumoniae* türünün etken olduğu solunum sistemi infeksiyonları daha çok adolesans çağındaki çocuklarla genç yetişkinlerde görülmektedir (2,3). Bu infeksiyonların % 77'si trakeobronşit, % 3'ü atipik pnömoni, % 20'siyse asemptomatik infeksiyon şeklinde seyreder (3). Genel olarak *M.pneumoniae*'nin etken olduğu solunum sistemi infeksiyonlarında, belirtilerin nonspesifik oluşu, ayrıca bu alanda hızlı tanı yöntemlerinin henüz yeni yeni geliştirilmekte oluşu, etkenin tanısını çoğu kez olanaksız kılmaktadır (2, 3). Ancak, *M.pneumoniae* infeksiyonlarının görülme sıklığının yüksekliği ve atipik pnömoni etkeni olarak bu bakterinin öneminin kavranması, tanı için yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalarını hızlandırmıştır.

*M.pneumoniae*'nin tanısında uygulanan çeşitli yöntemler genel olarak üç temel grupta incelenebilir:

- M.pneumoniae*'nin muayene maddelerinden izolasyonu
- Serolojik yöntemlerle *M.pneumoniae*'ye karşı oluşmuş antikorların gösterilmesi.
- M.pneumoniae* antijenlerinin muayene maddesinde direkt saptanması

## İzolasyon

*Mycoplasma*'ların izolasyonu amacıyla muayene maddesi olarak balgam, boğaz salgısı, nazofarinks salgısı, trakeal aspirat, akciğer biyopsi materyalinden yararlanılır (2-4). *M.pneumoniae* solunum epitel hücrelerine yapıştığı için muayene maddesi hastaya ait hücresel materyal de içermelidir (3). Muayene maddesi olarak aşığı solunum yollarından alınan muayene maddeleriyle *M.pneumoniae* tanısında başarı olasılığı artar (3,4). Muayene maddesinin alınmasında zaman çok önemli bir kriter değildir. Zaten hastalığın doğal süresi 6-8 haftadır ve hastalar belirtiler ortaya çıktıktan sonraki birkaç gün ile 1 hafta içinde hekime başvururlar (4).

*M.pneumoniae* kuruluğa duyarlı olduğu için, muayene maddesinin Amies, Stuart gibi bir transport besiyerinde veya normal üreme besiyerinde, laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir (4,5). Uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılan muayene maddesi + 4°C sıcaklıkta 1-2 gün, derin dondurucuda haftalarca bekletilebilir (4). Burada tek koşul muayene maddesinin içinde bulunduğu bekleme ortamında protein bulunmasıdır (2). Sıvı muayene maddeleri kapalı kaplarda ve kuru buz içinde laboratuvara yollanmalıdır (2,4,5).

*M.pneumoniae*'nin izolasyonu amacıyla, diğer *Mycoplasma*'

larda olduğu gibi, genelde et veya soya proteininden ibaret temel besiyerinin steroller ve peptid vs kaynağı olarak taze maya özeti ile zenginleştirilmesiyle elde edilen besiyerleri kullanılır (2,4,5). *M.pneumoniae*, diğer varlığı olası mikroorganizmalardan daha yavaş üredii için besiyerine bu hızlı üreyen mikroorganizmalar için inhibitör olan bazı antimikrobiyal maddeler ilave edilmelidir (2,4,5). *Mycoplasma*'ların dirençli olduğu penisilin, talyum asetat, amfoterisin B, polimiksin bu amaçla kullanılan antimikrobiyal maddelerdir (2). Son yıllarda *M.pneumoniae*'nin izolasyonunda başarıyla kullanılan SP-4 besiyeri difazik bir besiyeri olup esas olarak *Spiroplasma*'ların izolasyonu amacıyla geliştirilmiştir (2,4). Bu besiyerinin kullanımının *M.pneumoniae* izolasyonunda başarıyı %30-50 artırdığı saptanmıştır (4). Bu besiyerinde üreyen ve stereomikroskopta incelenen koloni morfolojisine göre *M.pneumoniae* olduğu düşünölen bakterinin tür düzeyinde kesin tanısı, biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi -ki burada *M.pneumoniae*'yi solunum yolları normal florasında bulunabilecek *M. orale*, *M.salivarium* gibi türlerden ayırt eden en önemli özellik glikozu fermente etmesidir- hemadsorbsiyon yeteneğinin ve beta-hemoliz yapma özelliğinin saptanmasıyla veya spesifik antiserumun varlığında üreme inhibisyon deneyiyle gerçekleştirilir (2,4).

## Serolojik Yöntemler

Günümüzde hasta muayene maddelerinden, *M.pneumoniae*'nin izolasyonunun külfetli ve çok fazla zaman gerektiren bir yöntem olması, daha sonra söz edilecek olan antijenin direkt olarak gösterilmesini amaçlayan yöntemlerinse pahalı olması nedeniyle kullanımları çok kısıtlı olup *M.pneumoniae* infeksiyonlarının tanısında serolojik yöntemler büyük önem taşımaktadır (2, 3,6). Klasik serolojik yöntemlerin yanı sıra, daha duyarlı ve daha özgül serolojik yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar da büyük hız kazanmıştır.

Serolojik deneylerin çoğunda olduğu gibi, *M.pneumoniae* infeksiyonlarının da tanısı, hastalığın erken akut fazında ve bunu izleyen 7-10 gün sonra alınan serum örneklerinde antikor titresinde anlamlı bir artışın saptanmasına dayanır (6). Akut faz serum örnekleri aynı yöntemle incelenmelidir. Serum, soğuk aglütininin pıhtıya absorbe olmasını önlemek için 20-37°C'de ayrıştırılmaktadır (2). Dilöle olmamış serum örnekleri +4°C'de kısa bir süre, -20°C'deyse uzun süre saklanabilir (2).

## Soğuk Hemagglütinasyon

*M.pneumoniae* tanısında uzun yıllardır çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle IgM sınıfından antikorlar saptanır. Hızlı, ucuz, basit bir yöntem oluşu, ayrıca soğuk hemagglütinin titresinde artışın hastalığın akut fazında değişim gösteren ilk patolojik parametreler arasında olması yöntemin sık kullanılma nedenidir (2,4, 6). Titrenin  $\geq 128$  olarak saptanması pozitifliğe işaret eder. Ancak pozitif sonuçların yorumlanmasında dikkatli olmak gerekir. Zira, birincisi soğuk hemagglütinasyon-pozitif nonbakteriyel pnömonilerin sadece küçük bir bölümünde etken *M.pneumoniae*'dir (6), ayrıca özellikle sonucun pozitif fakat titrenin düşük olduğu durumlarda, soğuk hemagglütininin, adenovirus, solunumsal sinsişüvirüsü, influenza virüsü infeksiyonlarıyla kolajen-vasküler hastalıklarda, myelomalarda ve bazı tropik hastalıklarda da ortaya çıktığı unutulmamalıdır (6). Deney sonucu negatif olarak

saptandığında, test 3-5 gün sonra alınan serum örneğiyle yinelenmeli ve titrede artış saptanmaya çalışılmalıdır. Negatif sonucun yorumlanması güçtür, zira hastaların salt 1/2'sinde soğuk hemaglutininler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle negatif sonuç *M.pneumoniae* kuşkusunu ortadan kaldırmaz (2,4). Bu deneyin bulguları başka testlerle konfirme edilmelidir.

#### **Kompleman Birleşmesi Reaksiyonu (KBR)**

1965'te ilk kez önerilerek uygulanmaya başlanan bu deney *M.pneumoniae* tanısında en sık kullanılan serolojik yöntemlerden biridir (6). Akut ve konvalesan serumda antikor titresinde 4 (ya da daha fazla) kat artış veya tek serum örneğinde titrenin  $\geq 32$  olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (6). KBR, kültür sonucu pozitif olguların % 85'inde pozitif sonuç vermektedir (6). 12 yıllık bir süreyi ve 3546 olguyu kapsayan bir çalışmada KBR'nun duyarlılığı % 90, özgüllüğü % 94 olarak saptanmıştır (6). Yine de KBR'nun bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri bu deneyde kullanılan ve *M.pneumoniae* hücrelerinden kloroform-metal ekstraksiyonuyla elde edilen ve *M.pneumoniae* için spesifik olmayan bir glikolipidin antijen olarak (kit olarak var) kullanılmasıdır (2,6). Bu glikolipide benzer moleküller, çeşitli insan dokularında, streptokok ekstrelerinde ve bazı bitkilerde bulunmaktadır (6). Özellikle, iltihabi reaksiyonlarda, konak hücreleri tarafından oluşturulan ve bu glikolipidle çapraz reaksiyon veren bazı otoantikolar yalnızca pozitifliğe yol açabilirler. Bu duruma bazı nörolojik sendromlarda, bakteriyel menenjitlerde, akut pankreatitte rastlanır (6). Bu nedenle, KBR, etyolojisi bilinmeyen hastalıkların ayırt edilmesinde kullanılmamalıdır. Yine de bu yöntem, çocuklarda ve yetişkinlerde, *M.pneumoniae*'nin etken olduğu solunum sistemi hastalıklarında, altta yatan başka bir hastalık düşünülmediği durumlarda, son derece uygun bir yöntemdir (2,6). KBR'nunda negatif sonuç *M.pneumoniae* kuşkusunu yok etmez. KBR'nunda birincil olarak "erken" IgM sınıfından antikorlar, az miktarda da ikincil olarak IgG'ler ölçülür (6). Buna bağlı olarak bu serolojik yöntem *M.pneumoniae* infeksiyonlarında, primer infeksiyonun başlangıç fazını saptamaıyla sınırlıdır ve tekrar fazındaki antikor yanıtını saptayamamaktadır (6).

*M.pneumoniae* infeksiyonlarının patogeneğinde primer ve sekonder infeksiyonun önemi büyüktür. Hayvan deneyleri, *M.pneumoniae* izolasyon oranının reinfekte hayvanlarda, ilk kez infekte olanlardan daha düşük olduğunu göstermiştir, fakat deneylerde, ne izolasyon oranının düşüklüğünün ne de KBR'nunda düşük antikor titresinin, *M.pneumoniae* infeksiyonunun klinik statüsünü yansıtmadığı saptanmıştır. Zira reinfekte hayvanlarda, histopatolojik bulgular, yeni infekte olmuş hayvanlardakinden çok daha ağır bir lenfositöz infiltrasyonu göstermektedir. Ayrıca hayvan deneyleri, ikincil infeksiyonlarda IgG ve IgA düzeylerinde görülen yüksek artışın IgM düzeyinde görülmediğini göstermiştir. Bu nedenlerle KBR, reinfeksiyon koşullarında, spesifik Ig sınıflarını ölçen diğer testlerden daha az tanısal anlam taşımaktadır (6).

#### **ELISA Teknikleri**

*Mycoplasma* serolojisinde son yıllarda giderek artan oranda kullanılmaya başlanan bu tekniklerde antijen olarak sonikasyonla elde edilen tüm hücre preparasyonları, tween-eter ekstraksiyonuyla elde edilen proteinler, SDS ile muamele edilmiş *M.pneumoniae* hücreleri kullanılmıştır (2,6). Ancak antijen olarak bu bileşiklerin kullanılmasının neden olduğu, çapraz reaksiyonlar gibi olumsuz koşulları ortadan kaldırmak üzere çalışmalar, Western blot tekniğiyle *M.pneumoniae*'nin daha spesifik antijen profillerini araştırmaya yönlendirilmiştir (6). Yapılan çalışmalarla, *M.pneumoniae* infeksiyonlarında hasta serumlarında özellikle *M.pneumoniae*'nin 170 kD'luk P1-membran proteinine karşı güçlü antikor yanıtı saptanmıştır. P1 proteinini izole edilerek spesifik, tanımlanmış antijen olarak kullanılmaya başlanmıştır (6,7). P1'in güçlü bir antijen olmanın yanı sıra *M.pneumoniae*'nin asal virülans faktörü olması nedeniyle, antijen olarak P1'in kullanılması P1- negatif *M.pneumoniae* ile kolonizasyonun P1- pozitif gerçek infeksi-

yondan ayırt edilmesi de sağlanmıştır (6). Ayrıca P1'in bazı araştırmalarda bildirildiği üzere solunum sistemi infeksiyonlarından da izole edilebilen- *M.genitalium*'un (6) MgPa'sıyla homolog olmayan amino asit dizilerinden elde edilen sentetik peptidler ELISA tekniklerinde kullanılabilir (6). ELISA teknikleriyle elde edilen bulgularla KBR yöntemiyle elde edilen bulgular arasında paralellik vardır (6). Özellikle P1 antijen olarak kullanıldığında ELISA tekniklerinin duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir (6). Bu yöntemle gerek total Ig'ler gerekse IgG ve IgM sınıfı antikorlar ayrı ayrı saptanabilmektedir (2,6). Farklı Ig sınıfı antikorların ayrı ve tek çeşidi seçilerek yapılan test sonuçları infeksiyonun seyrine ilişkin doğru bulguları yansıtmaz, bu saptama daha eski çalışmalarda elde edilen ve bazı hastalarda özellikle IgG ve özellikle gençlerde olmak üzere bazı hastalarda IgM sınıfı antikorların titresinde yükselme saptanması bulgularına da uymaktadır (6).

Total IgG + IgM veya bunlardan biri yerine ayrı ayrı her iki sınıf antikor titresinin de saptanması önemlidir (8). Bazı çalışmalarda sağlıklı kişilerde de yüksek titrede IgG'ler saptanmış olup bu bulgu geçirilmiş bir *M.pneumoniae* infeksiyonu olarak yorumlanmıştır, ayrıca yukarıda değinildiği gibi, özellikle yaşlılarda, IgM artışı olmamaktadır ki bu da bir reinfeksiyona işaret etmektedir. Ayrıca IgG titresinin normalde IgM'den daha geç yükselmesi, özellikle çocuklar olmak üzere bazı hastaların infeksiyon sürecinde özellikle baskın olarak IgM üretmeleri de her iki sınıfın birlikte değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır (6).

#### **$\mu$ -capture EIA [=IgM EIA]**

Bu yöntem ELISA plaklarında immobilize edilmiş  $\mu$  zincirlerine hasta IgM'lerinin bağlanmasıyla saptanmasına dayanmaktadır (6,9). *M.pneumoniae* için spesifik IgM'lerin varlığı yeni bir infeksiyonu gösterir. IgM'ler daha çok gençlerde görülmektedir (6). Antijen olarak sonikasyona tabi tutulmuş *M.pneumoniae* hücreleri kullanılmaktadır. Bu nedenle çapraz reaksiyon olasılığıdır (6).

#### **IHA (M)**

Bu yöntem sıgır eritrositleri üzerinde immobilize edilmiş  $\mu$  zincirlerine hasta serumundaki *M.pneumoniae* için spesifik IgM'lerin adsorbsiyonuna dayanmaktadır. Tüm hücrenin antijen olarak kullanılması nedeniyle özgüllüğü düşüktür (6).

#### **Antijenin Muayene Maddesinde Direkt Saptanması**

*Mycoplasma*'ların hücre duvarına sahip olmaları nedeniyle Gram preparasyonunun tanıda önemi yoktur. Buna karşılık Giemsa yöntemiyle veya karanlık alan, faz-kontrast veya elektronmikroskop yöntemleriyle daha başarılı görüntüler elde edilebilirse de bu yöntemler rutin uygulamalar için pratik ve uygun değildir (2,4).

*M.pneumoniae*'nin antijenlerinin muayene maddelerinde direkt olarak saptanmasına yönelik direkt teknikler geliştirilmiş ve geliştirilmektedir (9,10).

Bu teknikler arasında ticari olarak mevcut olan monoklonal antikorların kullanıldığı immünofluoresans tekniği, veya nükleik asid hibridizasyon tekniklerinin yanı sıra muayene maddelerinde antijenin direkt olarak gösterilmesinde en sık kullanılan teknik PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniğidir (9,10). PCR amacıyla iki tip primer kullanılabilir. Bunlardan biri *M.pneumoniae*'nin P1 proteini genlerine ait 153 bp'lik bir nükleotid dizisi olup, henüz ticari kit olarak bulunmamaktadır (7).

İkinci seçeneği oluşturan primer *M.pneumoniae*'nin [125I]'le işaretli olup 16 s rRNA genlerini komplemanter bir sentetik nükleotid dizisidir ve ticari kit olarak bulunmaktadır. Bu yöntemle örnekte  $10^3$  cfu saptanabilmekte olup P1 genlerinin primerinin kullanıldığı PCR tekniğine oranla daha duyarlıdır (9,11-13).

Antijenin muayene maddesinde direkt olarak saptanması amacıyla geliştirilmiş bir başka yöntem ise kitleri ticari olarak mevcut olan "antigen-capture EIA"dır. Antikor olarak, *M.pneumoniae*'nin tüm antijenik yapısına (glikolipid+protein) karşı elde edilen

tavşan bağışık serumu (absorblanmış ve fraksiyonlanmış olarak) kullanılır (6,8,14). Tavşanın bağışıklanmadan önceki serumu negatif kontroldür. Balgam örneklerinde, serolojik deneylerin pozitif olduğu olguların % 81'ini, negatif olduğu olguların % 94'ünü bu yöntemle saptamak mümkündür (14). Kültür yöntemine göre duyarlılığı % 40, özgüllüğü % 64'tür. Poliklonal antikorlar kullanıldığı için *M. genitalium* ile çapraz reaksiyonlar söz konusudur. Üst solunum yollarından çok, alt solunum yollarından alınan örneklerle iyi sonuçlar elde edilir. Ayrıca pnömonilerde, bronşit olgularına oranla, daha anlamlı olduğu saptanmıştır (14).

### Kaynaklar

1. Razin S. Characteristics of the Mycoplasmas as a group. In: Razin S, Tully JG, eds. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983
2. Bredt W. Mycoplasmen-Chlamydien-Rickettsien. In: Burkhardt F ed. *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart: Thieme, 1992
3. Jacobs E. Diagnostik von Chlamydien-und Mycoplasma infektionen des Respirationstrakt. *Immun Infekt* 1992; 20: 53-6
4. Clyde WC Jr, Kenny GE, Schachter J. Laboratory diagnosis of chlamydial and mycoplasmal infections. *Cumitech* 1984; 19: 1
5. Clyde WA Jr, Mc Cormack WM. Collection and transport of specimens. In: Razin S, Tully JG eds. *Methods in Mycoplasmaology*, New York: Academic Press, 1983
6. Jacobs E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. A critical review of current procedures. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 79-82
7. Jacobs E, Buchholz A, Kleinmann B, Bredt W. Use of adherence protein of *Mycoplasma pneumoniae* as antigen for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Isr J Med Sci* 1987; 23: 709-11
8. Uldum SA, Jensen JS, Sondergard-Anderson J, Lind K. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1198-204
9. Marmion BP, Williamson J, Worswick DA, Kok T-W, Harris RJ. Experience with newer techniques for the laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Adelaide 1978-1992. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 90-9
10. Razin S, Hyman HC, Nur I, Yogen D. DNA probes for detection and identification of mycoplasmas (Mollicutes). *Isr J Med Sci* 1987; 23: 735-42
11. De Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, Renaudin H, Dupon M, Bebear C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain-reaction. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 83-9
12. Gobel U, Maas R, Haun G, Vinga-Martins C, Stanbridge EI. Synthetic oligonucleotide probes complementary to rRNA for group-and species-specific detection of mycoplasmas. *Isr J Med Sci* 1987; 23: 742-7
13. Dular R, Kajioka R, Kasatiya S. Comparison of gen-probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1068-9
14. Kleemola M, Röty R, Karjalainen J, Schuy W, Geistenecker B, Jacobs E. Evaluation of an antigen-capture diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 872-5