ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINA NEDEN OLAN *MYCOPLASMA PNEUMONİAE* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLEMESİ

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM **"Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan *Mycoplasma Pneumoniae* Türlerinin Moleküler Olarak Belirlemesi"** adlı tez çalışması 01/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman **:** Prof. Dr. Basim Abdulhussein JARULLAH

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay Çorak ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN
Biyoloji Anabilim Dalı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Solunum Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan Mycoplasma Pneumoniae Türlerinin Moleküler Olarak Belirlemesi"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (13/01/2022).

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARINA NEDEN OLAN *MYCOPLASMA PNEUMONİAE* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLEMESİ

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Basim Abdulhussein JARULLAH

Mycoplasma pneumoniae toplum kökenli pnömoni vakalarının %10 ila %20'sinden sorumlu olup akut astım alevlenmeleri ile ilişkilendirilmiştir. *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonunu tespit etmek amacıyla 16S rDNA bazlı polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kullanımı araştırılmıştır. Çalışmamızda, yaşları 20 ile 70 arasında değişen, solunum yolu hastalığı ve pnömoni kanıtı olan 57 erkek ve 43 kadın olmak üzere 100 hastadan alınan balgam örnekleri PCR ile analiz edilmiştir. Aynı şekilde, kontrol grubunun %40'ini oluşturan 16 kadın ve toplam kontrol grubunun %60'sini oluşturan 24 erkek olmak üzere toplam 40 sağlıklı bireyden alınan balgam örnekleri de 20 ila 70 yaş aralığında olmuştur. Bu araştırmanın sonucunda klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu teşhisi konan 100 hastadan 26'sı (%100) yani 26 hastadan 16'sı (%61,54) erkek ve 26 (%100) hastadan 10'u (%38,46) kadın olmak üzere *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu için pozitif sonuç göstermiştir. Başarılı bir singleplex PCR reaksiyonunda, jel elektroforezi üzerine 277 bp moleküler ağırlıklı 16S rDNA ürünü gözlenmiş olup, bandının 100 bp DNA merdiveninin 200-300 bp bantları arasında yer alması bu genin varlığını göstermektedir. Oysa ki, İnsan beta-globin geni, numune kalitesinin ve nükleik asit ekstraksiyonunun yanı sıra amplifikasyon işlemlerinin değerlendirilmesini sağlamak amacıyla iç kontrol olarak dahil edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, farklı pnömoni vakaları ile ilişkili *Mycoplasma pneumoniae* tespiti için singleplex PCR tekniği ile 16S rDNA kullanımının uygun ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir.

2022, 51 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *M. Pneumoniae*, Kültür teknikleri, Seroloji, PCR, ELISA, 16S rRNA geni, P1 yapışması, Antibiyotikler

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DETERMINATION OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE* SPECIES CAUSED BY RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Basim Abdulhussein JARULLAH

Mycoplasma pneumoniae is responsible for 10 to 20% of community-acquired pneumonia cases and has been associated with acute asthma exacerbations. The use of a 16S rDNA- based polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection was investigated. In our study, sputum samples from 100 patients divided into 57 male and 43 female their age's ranges from 20-70 years old, with respiratory illness and evidence of pneumonia were analyzed by PCR . Sputum samples from 40 healthy individuals that distributed into 16 females which formed 40% and 24 males which formed 60% from the total number of control group also their age's ranges from 20-70 years old. Result 26 out of 100 patients clinically diagnosed with respiratory tract infections were showed positive results for *Mycoplasma pneumoniae* infection included 16(61,54%) males out of 26(100%) patients, and 10(38.46%) females out of 26(100%) patients. In successful singleplex PCR reaction, the 16S rDNA product of 277 bp molecular weight was observed, upon gel electrophoresis, its band was located between 200-300 bp bands of the 100 bp DNA ladder indicating the presence of this gene. Human betaglobin gene was included as an internal control to allow assessment of the specimen quality and the nucleic acid extraction as well as the amplification processes. Our results indicate that the use of 16S rDNA by singleplex PCR technique suitable and rapid method for detection of *Mycoplasma pneumoniae* associated with different pneumonia cases.

2022, 51 pages

Keywords: *M. Pneumoniae*, Cultural techniques, Serology, PCR, ELISA, 16S rRNA gene, P1 adhesion, Antibiotics

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımda tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destekleyen en değerli insanlar babam ve annem, çalışmanın her sayfasında yakın ilgili ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, büyük bir anlayış gösteren ve hiç kırmayan değerli hocalarım Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Basim Abdulhussein JARULLAH'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 *Mycoplasma pneumoniae* **4**
2.2 MP Izolasyonu, Kültürü ve Tanımlama **5**
2.2.1 İzolasyon, kültür ve tanımlama **5**
2.2.2 Metodolojik değerlendirme **7**
2.3 Serolojik Tanı **8**
2.3.1 Serolojik tanı yöntemi **11**
2.3.2 Metodolojik değerlendirme **12**
2.4 Moleküler Biyolojik Tanı **13**
2.5 Moleküler Biyolojik Tanı Yöntemi **20**
2.5.1 Yuvalanmış polimeraz zincir reaksiyonu **20**
2.5.2 Real-time quantitative PZR **20**
2.5.3 LAMP teknolojisi **21**
2.5.4 NASBA **21**
2.5.5 SAT teknolojisi **22**
2.5.6 Bileşik PCR **22**
2.6 Hedef Genin Seçimi **22**
2.7 Örnek Seçimi **23**
2.8 Doğrudan Antijen Tespiti ve Nükleik Asit Hibridizasyonu **23**
3. MALZEMEL VE METOD **25**
3.1 Materyaller **25**

3.1.1 Ekipmanlar ve aletler 25
3.1.2 Kimyasallar 26
3.1.3 Kitler 26
3.1.4 Reaktifler ve çözümler 26
3.2 Metod 27
3.2.1 Sterilizasyon metodları 27
3.2.2 Çalışma popülasyonu 27
3.2.3 Numune toplama 28
3.2.4 DNA ekstraksiyonu 28
3.2.5 Agaroz jel elektroforezi 29
3.2.6 Ekstrakte edilen DNA'nın analizi 30
3.2.7 Genomik DNA konsantrasyonu ve saflığının tahmini 31
3.2.8 Singleplex pcr ile *Mycoplasma pneumoniae'nin* 16S rDNA'sının tespiti 31
3.2.9 *Mycoplasma pneumoniae* β-Globin geninin singleplex PCR ile tespiti 33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1 Nüfus Çalışma Grupları 36
4.2 DNA Ekstraksiyonu 36
4.3 *Mycoplasma pneumoniae'nin* 16S rDNA'sının Singleplex PCR İle Tespiti 37
4.4 *Mycoplasma Pneumoniae* β-Globin Geninin Singleplex PCR İle Tespiti 39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 41
KAYNAKLAR 42
ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
>	büyük
µL	Mikrolitre
Co_2	karbon dioksit
g	gram
IU	İnternasyonel ünite
kDa	kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
º	Derece
ºC	Santigrat derece
U	ünite
β	Beta

KISALTMALAR DİZİNİ

CA	Soğuk aglütinasyon
CF	Tamamlayıcı fiksasyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent testi
FDA	Gıda ve ilaç idaresi
LAMP	Döngü aracılı izotermal amplifikasyon
MP	*Mikoplazma Pnömonisi*
MPP	*Mycoplasma Pneumoniae Pneumoniae*
NAAT	Nükleik asit amplifikasyon teknikleri
NASBA	Nükleik asit dizi tabanlı amplifikasyon
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SAT	Eş zamanlı amplifikasyon ve test

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Balgam örneklerinden ekstrakte edilen DNA'nın 6 vol/cm'de 1 saat boyunca 1% agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1-7: Çıkarılan DNA. 37
Şekil 4.2 *Mycoplasma pneumoniae'nin* singleplex PCR ürününün 7 volt/cm'de 1 saat boyunca 1.5% agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1: 100 bp DNA merdiveni, şerit 2-10: 16S rDNA'nın Singleplex PCR ürünü.....38
Şekil 4.3 *Mycoplasma pneumoniae'nin* singleplex PCR ürününün 7 volt/cm'de 1 saat boyunca %1.5 agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1: 100 bp DNA merdiveni, şerit 2-7: β-Globin geninin Singleplex PCR ürünü. 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve araçlar, şirketleri ve menşeileri. 25
Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, şirketleri ve menşeileri..... 26
Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kitler, firmaları ve menşeileri. 26
Çizelge 3.4 *Mycoplasma pneumoniae* adı ve dizisi. 31
Çizelge 3.5 *Mycoplasma pneumoniae'nin* 16S rDNA'sını saptamak icin Singleplex PCR ana karışımı. 32
Çizelge 3.6 *Mycoplasma pneumoniae'nin* 16S rDNA'sını saptamak icin Singleplex PCR programı. 33
Çizelge 3.7 *Mycopasma pneumoniae* primerlerinin adı ve dizisi. 34
Çizelge 3.8 *Mycoplasma pneumoniae'nin* β-globin genini saptamak için singleplex PCR ana karışımı. 35
Çizelge 3.9 *Mycoplasma pneumoniae'nin* β-Globin genini saptamak için singleplex PCR programı. 35

1. GİRİŞ

Mycoplasma pneumoniae, toplum kökenli pnömoni vakalarının %10 ile 20'sinden sorumludur ve akut astım alevlenmeleri ile ilişkilendirilmiştir. *M. pneumoniae* ayrıca boğaz ağrısı, farenjit, rinit ve trakeobronşit gibi hafif akut solunum yolu enfeksiyonlarında da rol oynar (Gil *et al.* 1993).

M. pneumoniae enfeksiyonlarının doğru teşhisi, bir *M. pneumoniae* enfeksiyonunun yalnızca klinik belirti ve semptomlara dayalı olarak tanımlanması imkansız olduğundan, hastaların uygun antibiyotik tedavisine izin vermesi açısından önemlidir. Uygunsuz antibiyotik kullanımını azaltmalı, morbidite ve mortaliteyi azaltarak hasta sonuçlarını etkilemeli ve sözde atipik pnömoni nedenlerinin yaygınlığı hakkındaki bilgilerimizi geliştirmelidir.

M. pneumoniae'nin tespiti için geleneksel tahlillerin kendi sınırlamaları vardır ve bu da daha doğru teşhis yöntemlerine ihtiyaç duyulmasına neden olur. Kültür, zaman alıcıdır ve nispeten duyarsızdır, çünkü *M. pneumoniae* in vitro olarak yavaş büyür ve kolonilerin görünür hale gelmesi için 2 ila 5 hafta gerekir. Serolojik yöntemler, özellikle kompleman fiksasyon (CF) testi en yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tahlillerin duyarlılığı, ilk serum numunesinin hastalığın başlangıcından sonra erken mi yoksa geç mi toplanacağına ve 2 ila 3 hafta aralıklarla toplanan eşleştirilmiş serum numunelerinin mevcudiyetine bağlıdır. CF testinden daha duyarlı olan immünoglobulin M (IgM) testleri geliştirilmiştir, ancak IgM yanıtı spesifik olmayabilir veya özellikle yetişkinlerde olmayabilir. DNA probları ile hibridizasyon, kültürü değiştirmek için hızlı ve spesifik bir prosedür olarak da önerilmiştir, ancak duyarlılıktan yoksundur (Sillis 1993, Uldum *et al.* 1992).

Mikoplazma pnömonisi, her iki cinsiyetten tüm yaş gruplarını enfekte eden solunum sistemi için en yaygın bulaşıcı ajanlardan biridir (Huang *et al*. 2001). Çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olduğu bilinmektedir. Spesifik bir tanı, uygun tedaviyi başlatmak için önemlidir. Mikoplazmaya bağlı enfeksiyon, ılıman bölgelerde daha yaygın olmasına rağmen, dünyanın birçok bölgesinde endemiktir.

Enfeksiyon yılın tüm aylarında görülür, ancak yaz sonu ve sonbahar başında biraz daha sık görülür. *M. pneumoniae*, çocuklarda ve yetişkinlerde en sık görülen solunum yolu hastalıklarından biridir.

Bakteriler gibi Mikoplazmalar da hücresiz ortamlarda büyüyerek birincil fisyonla çoğalır (Foy 1993, Clyde 1993). Bu tür enfeksiyonların tanısı genellikle kompleman fiksasyonu veya daha yakın zamanda enzim-immüno tahlilleri kullanılarak serolojiye dayanır. PZR'nin umut verici bir alternatif olduğu gösterilmiştir ve Gerçek zamanlı PZR'nin duyarlılık ve özgüllük açısından geleneksel PZR olarak klinik örnekler üzerinde eşit değere sahip olduğu kanıtlanmıştır, ancak çalışma başına analiz edilebilen örneklerin hızı, işlenmesi ve sayısı açısından açıkça avantajlıdır. PZR hassasiyeti çok yüksektir, saflaştırılmış DNA kullanıldığında teorik olarak tek bir organizmaya karşılık gelir (Waites and Talkington 2004). Diğer avantajlar, prosedürü bir gün içinde tamamlama potansiyeli, hastalığın başlangıcından serolojiye göre daha erken pozitif bir sonuç elde etme olasılığı, canlı olması gerekmeyen organizmaları içeren sadece bir numunenin gerekliliğidir (Saito *et al.* 2005).

Nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAAT'ler), erken uygun antibiyotik tedavisine izin vererek hızlı, hassas ve spesifik sonuçlar üretme potansiyeline sahiptir. Mikoplazmaların antimikrobiyal ajanlara duyarlılık paterni, mikoplazmaların penisilin ve sefalosporinler gibi antibakteriyel ajanların hedefi olan bir hücre duvarına sahip olmaması bakımından benzersizdir. İnsan mikoplazmaları ve ureaplazmaları genellikle tetrasiklinlere ve kinolonlara duyarlıdır. Etken patojenler, edinme yöntemleri ve sonuçlar, farklı pnömoni tiplerinde farklılık gösterir ve üç geniş pnömoni tipinin tanınmasına yol açar. Bunlar toplum kökenli ve hastane kaynaklı (nozokomiyal) pnömoniler ve bağışıklığı zayıflamış pnömonidir. Bir dizi farklı mikrobiyal patojen düzenli olarak her klinik ortamda pnömoniye neden olur, En sık görülen organizma S. pneumoniae'dir. 5 yaşından küçük çocuklarda Mikoplazma enfeksiyonları çoğunlukla hafif ve pnömonik değildir. Başlıca semptomları eşzamanlı ateş olmadan coryza ve hırıltıdır (Clyde 1993). 5 ila 15 yaş arasındaki çocuklarda, Mikoplazmaya bağlı pnömoni riski maksimumdur. İlk tezahür genellikle boğaz ağrısı ve ardından ses kısıklığı veya disfonidir. Enfeksiyon trakea, bronşlar ve bronşiyollere ulaştığında, inatçı

bir öksürük ortaya çıkar (Luby 1991). Bu tezin verileri, bu konudaki önceki verileri destekleyebilir veya *M. pneumoniae* ile ilişkili yaygınlık ve virülans faktörü hakkında yeni veriler ekleyebilir.

Bu tezin amacı, solunum sisteminin uzun süreli enfeksiyonlarının önemli bir etkeni olan *Mycoplasma* türlerinin moleküler biyolojik yöntemlerle PZR metodu kullanılarak tespit edilmesidir. Bu tezin amacı, 20-70 yaş grupları için uzun süreli solunum yolu enfeksiyonlarında önemli bir faktör olan *Mycoplasma pneumoniae*'yi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini kullanarak tespit etmektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Mycoplasma Pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae (MP), hücre duvarının olmamasıyla ayırt edilen Mollicutes sınıfına aittir. Prokaryotlar arasında MP, minimum hacme ve en kısa gen fragmanına sahip en küçük hücre biyolojisine sahiptir ve özerk olarak kopyalanabilir. MP, esas olarak üst solunum yolunun akciğer epitel hücrelerine yapışan, konakçı hücreleri güçlü bir şekilde adsorbe eden uç benzeri bir yapıya sahiptir. Konakçı hücrelere dayanarak hayatta kalmak için gerekli besinleri sağlar. Konakçı ve patojenin solunum yolunun yüzeyindeki etkileşimi, konakçı tarafından temizlenip temizlenmediğini belirler ve kalan bakteri miktarı klinik enfeksiyon semptomlarına neden olup olmadığını belirler. MP enfeksiyonu yalnızca insan vücudunda hastalığa neden olur. Damlacıklar yoluyla yayılır ve solunum yolunda 1-3 hafta inkübasyonla birkaç hafta veya birkaç ay yaşayabilir (Sauteur *et al.* 2014).

MP enfeksiyonu mevsimsel bir hastalıktır ve sıklıkla sonbaharda edinilir. Çoğu MP enfeksiyonu hafif klinik semptomlara neden olur ve kendi kendini sınırlayan özelliklere sahiptir. MP, insanların miyokardiyum, akciğer ve beyin dokusuyla ortak bir antijene sahiptir. Enfekte olduktan sonra vücut, bir antijen-antikor kompleksi oluşturmak için insan miyokardiyumu, karaciğer, akciğer ve beyin dokusuyla çapraz antijen antikor reaksiyonu oluşturabilen ve pnömoni, artrit, hemolitik anemi gibi ekstrapulmoner doku lezyonlarına neden olan bir antikor üretir.

MP enfeksiyonu her yaşta ortaya çıkabilir, genellikle en düşük insidans yaşlı insanlar arasında, onu yetişkinler izler ve en yüksek insidans okul çağındaki çocuklar ve ergenler arasında görülür. MP enfeksiyonu, toplum kökenli pnömoninin (CAP) önemli bir patojeni olup, çocukların CAP'sinin yaklaşık %10-30'unu oluşturur (Gotoh *et al.* 2012, Zhou *et al.* 2015). MP enfeksiyonları, ev, okul, kurum, kamp alanı ve askeri üs gibi yoğun nüfuslu alanlarda meydana gelir ve 1 yıla kadar her 3-7 yılda bir salgın ortaya çıkar. Asemptomatik MP taşıma oranının her yaştan çocukta yüksek olduğunu gösterdi. Mycoplasma pneumoniae pneumoniae (MPP) hastalarında ekstrapulmoner yaralanma

insidansının%25 gibi yüksek olduğunu bildirdi. Şu anda, ilaca dirençli MP, çocuklarda MP enfeksiyonuna neden olan ana patojendir ve ilaca dirençli MPP dünya çapında yayılmıştır. Çin, Japonya ve Güney Kore gibi Doğu Asya ülkelerinde oldukça yaygındır ve Kuzey Amerika ve Avrupa'da nispeten düşüktür. MP ve ilaca dirençli MP'nin erken, hızlı ve doğru teşhisi, hastalığın klinik tedavisi, prognozu ve sonucuna rehberlik etmede çok önemli bir rol oynar (Sauteur *et al.* 2014, Gotoh *et al.* 2012).

2.2 MP İzolasyonu, Kültürü ve Tanımlama

2.2.1 İzolasyon, kültür ve tanımlama

MP izolasyonu ve kültürü, MP enfeksiyonunun tanısında altın standarttır. MP genellikle pnömonili hastaların boğazından, nazofarenksinden, plevral efüzyonundan veya vücut sıvısından izole edilir. MP, kolesterol içeren bir hayvan yapay besiyerinde büyüyebilir, 37 °C'de birkaç saat hayatta kalabilir ve yavaş bir hızda ve uzun bir kültür periyoduyla (10-14 gün veya daha uzun) iki aralıklı bir formda çoğalabilir. Örnekler bir mikrobiyal plörezi kültür ortamına aşılanır ve karıştırılır ve 37 °C'de %5 CO_2 inkübatörüne yerleştirilir ve negatif ve pozitif kontroller hazırlanır (MP standart suşu M129). MP, asit üretmek için ortamdaki amylaceumu fermente eder. Orta pH ve sararan fenol kırmızısı göstergesinde bir azalma, MP büyümesini gösterir (Waites *et al.* 2008).

Bilimsel amaçlar için, *M. pneumoniae* kültürü çoğunlukla Hayflick's, New York City, Soy Peptone veya SP-4 ortamı gibi hücresiz formülasyonlarla gerçekleştirilir. Başlangıçta *Spiroplasma spp.*'nin izolasyonu için geliştirilmiş olan son formülasyon en etkilidir. Diğer patojenlerin aşırı çoğalmasını önlemek için geniş spektrumlu bir β laktam antibiyotik ve bir antifungal ajan eklenmelidir, örn. penisilin G (100.000 U/mL) ve amfoterisin B (0,5 mg/mL). *M. pneumoniae* kültivasyonu için ticari olarak temin edilebilen bir sistem de vardır (Pneumofast, International Microbic Signes, Fransa). İzolasyon yapılacağı zaman, klinik örneklerin laboratuvara uygun şekilde taşınması çok önemlidir. En önemlisi, mikoplazmalar kurumaya karşı savunmasızdır. Özellikle, swablar uygun bir taşıma ortamında, örn. %0,5 sığır serum albümini içeren triptikaz soya suyu. Taşıma süresi 4 saatten az olmalıdır. Bununla birlikte, nakil daha fazla

zaman gerektiriyorsa, mikoplazmaların canlılığı, numuneler yaklaşık 4 °C'lik bir sıcaklıkta tutularak korunabilir. Mikoplazma kültürü için eşzamanlı fizyolojik flora içeren numuneler gönderildiğinde (örn. Solunum yolu numuneleri), taşıma besiyerine geniş spektrumlu bir antibiyotik eklenmelidir (Granato *et al.* 1980).

M. pneumoniae'nin izolasyonu yavaş ve duyarsızdır ve bu nedenle rutin tanı için önerilmez. Mycoplasma'nın kültürlenmesindeki zorluk, patojenin kapsamlı beslenme gereksinimlerinden kaynaklanmaktadır. Tüm mikoplazmalar gibi, *M. pneumoniae* de sadece küçük bir enzim seti içerir. *M. pneumoniae* genomunun tam sekanslanması, bu patojenin, *Escherichia coli*'deki yaklaşık 4000'e kıyasla 677 öngörülen protein kodlama sekansına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. *M. pneumoniae,* amino asit biyosentezini yapamaz. Ayrıca, çoğu kofaktör ve yağ asitlerinin yanı sıra nükleik asit öncüleri de çevreden alınmalıdır (Razin 1997).

Gerekli inkübasyon süresi, 4 gün ile birkaç hafta arasında değişen bir aralıkla, büyük ölçüde ilk inoküluma bağlıdır. Et suyu kültürlerinde, *M. pneumoniae*'nin büyümesi fenol kırmızısı ile gösterilir. Bakteriler tarafından glikoz kullanımının bir sonucu olarak asit üretimi, et suyunun sararmasına neden olur. Agar plakalarında, küçük *M. pneumoniae* kolonileri tipik bir granül görünüm sergiler. Bununla birlikte, *M. pneumoniae'*nin diğer mikoplazmalardan tek başına koloni morfolojisi temelinde ayırt edilmesi mümkün değildir. Benzer bir koloni morfolojisi gösteren *M. genitalium* varlığı yanıltıcı yorumlara yol açabilir. Bu nedenle, *M. genitalium*'un büyümesini seçici olarak engelleyen talyum asetat kullanımı daha önce önerilmişti, ancak toksisitesi nedeniyle bu maddeden kaçınılmalıdır. Öte yandan, *M. genitalium* ve *M. pneumoniae* antimikrobiyal ajanlara karşı aynı duyarlılığı göstermektedir. Bu iki türün karışımları ürogenital, solunum ve sinovyal sıvı örneklerinde görülebilir (McCormack 1993).

İzolasyon veya doğrudan patojen tespitinin hassasiyetini değerlendirmek için, mikoplazmaların sayısı koloni oluşturan birimler (CFU'lar), renk değiştiren birimler (CCU'lar) veya kopya numaraları olarak ifade edilir. Harris ve Stephens (1988) göre bir CFU'nun 160 bakteri hücresi ve Razin (1997)'e göre 10-1000 hücre içerdiği tahmin edilmektedir. Bir CCU'nun 10-100 organizma içerdiği tahmin edilmektedir. Akut

enfeksiyon sırasında solunum sekresyonlarında 102 ile 104 CCU/mL arasında bulunur (Skakni *et al.* 1992).

Kültür yöntemleriyle yaklaşık 10^5 CFU/mL tespit edilebilir. Bu, kabaca, PZR'den daha az duyarlı olan üç log dilüsyondur. PCR ile çözüldüğünde, solunum örneklerinden *M. pneumoniae* izolasyonunun duyarlılığı %61'e kadar düşmüştür. Duyarlılık ve ayrıca mikoplazma büyümesinin hızı, hücre yaprak kültür sistemleri, örn. HeLa 229 hücreleri kullanarak gerçekleştirilir. Bu yöntem uygulanırsa, *M. pneumoniae* büyümesi immünofloresans (hücreler), PZR veya antijen tespiti (sıvı faz) ile 5 günlük inkübasyondan sonra belirlenebilir. Agar plaklarında izolasyonun hassasiyeti, difazik besiyeri kullanılarak artırılabilir. Kültür destekli PZR, DNA polimeraz inhibitörlerini ortadan kaldırmak için yararlıdır, böylece duyarlılıkta önemli bir kayıp önlenir. Bu amaçla, klinik numuneler, ör. boğaz sürüntüleri, DNA ekstraksiyonundan önce gece boyunca et suyu kültür ortamında inkübe edilir (Abele-Horn *et al.* 1998).

M. pneumoniae kültürünün düşük duyarlılığına rağmen, patojenin izolasyonu ekstrapulmoner belirtilerin patogenezine dair bazı bilgiler sağlamıştır, çünkü başarılı izolasyon, canlı mikoplazmalar tarafından doğrudan invazyonun kanıtını sağlar. Pozitif PCR sonuçlarından benzer bir sonuca mutlaka varılamaz çünkü hedef DNA, bakterinin ölümünden sonra bir süre devam edebilir. Ayrıca, *Mycoplasma* DNA'sının antijen sunan hücreler tarafından ekstrapulmoner bölgelere taşınabileceği varsayılmıştır. Başlangıçta kültür teknikleriyle gösterilmiş olan *M. pneumoniae* tarafından merkezi sinir sisteminin olası istilasına büyük ilgi odaklanmıştır.

2.2.2 Metodolojik değerlendirme

MP izolasyonu ve kültürü, özel bir ortam ve laboratuvar koşulu gerektirir. MP enfeksiyonu tanısının duyarlılığı, numune kaynağı, koruma, taşıma modu, numunedeki MP içeriği ve laboratuvar teknisyeninin teknik seviyesi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak yalnızca % 60'tır. Bu yaklaşım, erken klinik teşhis için yetersiz öneme sahiptir ve sıklıkla geriye dönük teşhis ve araştırma için kullanılır (Silvia *et al*. 2011).

2.3 Serolojik Tanı

Çin'de serolojik yöntem, serumdaki MP'ye özgü antikor titrelerindeki değişiklikleri tespit eder ve bu nedenle genellikle MP enfeksiyonunu teşhis etmek için kullanılır. Test yöntemleri arasında, kompleman fiksasyon testi (CFT), jelatin aglütinasyon (PA) testi, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), spesifik olmayan test ve soğuk aglütinasyon testi dahil olmak üzere spesifiklik testleri bulunur. Şu anda, MP enfeksiyonunun serolojik testle teşhisi için bir standart oluşturulmayı beklemektedir. Akut ve geri kazanım aşamalarında eşleştirilmiş serum örneklerinde MP enfeksiyonu, MP'ye özgü antikor titresi dört kat veya daha fazla arttığında veya azaldığında teşhis edilir. Bununla birlikte, eşleştirilmiş serum testinin fizibilitesi zayıftır ve erken teşhis değeri yoktur. Tek seruma özgü IgM antikorunda önemli bir artış, MP enfeksiyonunun klinik teşhisi için ana laboratuvar temelidir. Son yıllarda, PA yöntemi klinik uygulamada IgM antikorlarını ölçmek için kullanılmaktadır. Genel olarak, MP-IgM ≥1: 160 yüksek bir tanısal değere sahiptir (Barry *et al.* 2006).

Seroloji, *M. pneumoniae* enfeksiyonunun teşhisinde önemli bir araçtır. Serolojinin rutin tanıdaki baskın rolü, kısmen örnek toplama kolaylığı ve serolojik testlerin yaygın olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, belirli bir pnömoni atağında *M. pneumoniae*'nin nedensel rolünün kesin kanıtı açısından da, seroloji doğrudan patojen tespiti ile değiştirilmekten çok uzaktır.

Daha gelişmiş serolojik tekniklerin bulunmasından önce, soğuk aglütininlerin saptanması *M. pneumoniae* teşhisi için değerli bir araç olarak kabul edildi. Soğuk aglutininlerin oluşumu, *M. pneumoniae*'ye karşı ilk humoral yanıttır. Enfeksiyondan sonraki 6 hafta içinde, soğuk aglütinin titresi önceden var olan seviyeye doğru düşer. Bu otoantikorların belirlenmesi hızlı ve gerçekleştirmesi basittir. Bununla birlikte, soğuk aglutininler, hastaların sadece %50-60'ında yükseldiklerinden, *M. pneumoniae* enfeksiyonunun çok güvenilir göstergeleri değildir. Ayrıca, çeşitli diğer bulaşıcı ajanlar tarafından da indüklenirler, ör. Epstein–Barr virüsü, sitomegalovirüs ve *Klebsiella pneumoniae*'nin yanı sıra lenfoid hücrelerin maligniteleri ve otoimmün hastalıkların seyrinde (Hosker *et al.* 1993).

On yıl öncesine kadar, kompleman fiksasyon (CF) testi, *M. pneumoniae* serolojisinde standart kabul edildi. Bununla birlikte, KF testinin hem duyarlılık hem de özgüllüğünün eksikliği kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır. Bu testte kullanılan antijen, insan, bakteri ve bitki epitopları ile çapraz reaksiyonlara girebilen *M. pneumoniae*'nin bir kloroform-metanol glikolipid özütüdür. Örneğin, bakteriyel menenjitli hastalarda antikor titresinde önemli bir artış gözlenirken, immünoblotlama ile spesifik antikorlarda hiçbir artış gösterilememiştir. Daha yeni tekniklerle değiştirilen metabolik inhibisyon testleri için aynı glikolipid antijen kullanıldı. CF testine daha gelişmiş bir alternatif, mikropartikül aglütinasyon testidir. Bu testin prensibi, *M. pneumoniae*'ye özel antikorlar tarafından hemaglütinasyondur. Eritrositler, spesifik olmayan reaksiyonlardan kaçınmak için lateks partikülleri ile değiştirilir (Kleemola and Kayhty 1983, Barker *et al*. 1990).

Bununla birlikte, ne CF testi ne de MAG, antikor sınıfları arasında farklılaşmaya izin vermez ve bu da tanıda gecikmeye yol açabilir. Spesifik IgG antikorlarının seviyesi, hastalık sırasında yavaşça artar ve klinik semptomların başlamasından 5 hafta sonra zirve titrelerine ulaşır. Genellikle, hastalığın ilk haftasında ölçülebilir IgG yanıtı gözlenmez. Enfeksiyondan sonra bu antikorlar 4 yıla kadar yüksek kalır. Düşük, ancak saptanabilir IgG antikor seviyeleri bu nedenle, akut enfeksiyonun erken aşamasını veya geçmiş bir hastalığı gösterebilir. Düşük seviyede spesifik IgG olması durumunda, antikor titresinde önemli bir artış olduğunu göstermek için 2 veya 3 haftalık bir aradan sonra ikinci bir numune incelenmelidir. CF testi ve MAG sübjektif testler olduğundan, bir tanı koymak için titrede en az dört kat artış gerekir. CF testi (> 1: 80) veya MAG (> 1:160) ile ölçüldüğü üzere oldukça yüksek bir titre olduğunda, tek bir antikor tayini temelinde tanı konulabilir (Jacobs *et al.* 1986).

Hızlı bir tanı elde etmek için, IgM veya IgA antikorlarının ayrı ayrı saptanması yardımcı olur. IgM antikorları hastalığın ilk haftasında ortaya çıkar ve üçüncü haftada en yüksek titrelere ulaşır. Birkaç ay içinde düşük seviyelere (ticari tahlillerin kesme değerinin altında) doğru düşer. IgM temelli tanının önemli bir dezavantajı, bu antikorların büyük olasılıkla daha önceki birden çok enfeksiyonun bir sonucu olarak yetişkinlerde sürekli üretilmemesidir. Bu nedenle, negatif bir IgM sonucu, yaşlılarda akut *M. pneumoniae* enfeksiyonunu dışlamaz. Aksine, IgM ölçümünün pediyatrik hastalarda yararlı olduğu

gösterilmiştir. Son çalışmalar, spesifik IgA belirlenmesinin üstün tanısal doğruluk sağladığını ileri sürmüştür. Bu antikorlar da hastalığın seyrinin erken döneminde üretilir, ancak oluşumları daha güvenilir bir şekilde gerçekleşir. IgA ve IgM tayini için tahliller çoğunlukla ELISA prensibine dayanır. Farklı şirketlerden çeşitli test kitleri mevcuttur. IgM tayini için, hızlı bir kart temelli tahlil de geliştirilmiştir (Matas *et al.* 1998).

Bu ELISA testlerinin özgüllüğü ile ilgili temel bir gereklilik, *M. pneumoniae* ile en yakın ilişkili tür olan *Mycoplasma genitalium*'a karşı antikorlarla olası çapraz reaksiyonlardan kaçınmaktır. *M. genitalium*'un (140 kDa) MgPa proteini, *M. pneumoniae*'nin (169 kDa) P1 proteini ile yüksek derecede benzerlik gösterir. Her iki protein de sitoadherans için önemlidir ve P1 proteini aynı zamanda *M. pneumoniae*'nin en güçlü immünojenik belirleyicisidir. *M. genitalium*'a karşı yüksek antikor seviyeleri çoğunlukla ürogenital enfeksiyondan kaynaklanırken, bu patojenin solunum yolu hastalıklarındaki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Spesifik olmayan reaksiyonların üstesinden gelmek için, tam protein preparatları yerine kısa sentetik peptitler kullanılabilir. Antijenik modelde bir değişiklik, örn. Birkaç *Mycoplasma* türü için gösterilen antijenik varyasyon (aynı enfeksiyöz epizot sırasında farklı epitopların sıralı ekspresyonu), *M. pneumoniae* enfeksiyonunun serolojik tanısını engellemez (Vu *et al.* 1987).

M. pneumoniae için bir Western immunoblot tekniği yakın zamanda geliştirilmiştir ve ticari olarak mevcuttur. Bu yöntem şu anda anti-*M. pneumoniae* antikorları nin tespiti için en spesifik tekniktir. Dahası, diğer tahlillere göre daha düşük antikor seviyelerinin tespitini sağlar. Serebrospinal sıvıda (BOS) spesifik antikorların tespiti, şüpheli mikoplazma merkezi sinir sistemi hastalığı vakalarında ek bilgi sağlar. Son çalışmalar, *M. pneumoniae*'ye karşı en azından IgG ve IgM antikorlarının intratekal sentezi olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, BOS'ta spesifik antikorların saptanmadığı PZR ve kültürle kanıtlanmış vakalar bile tanımlanmıştır. Bu bulgular, yüksek antikor seviyelerinin organizmanın büyümesini etkili bir şekilde engellediği hipotezinin lehinedir (Narita *et al.* 1992).

2.3.1 Serolojik tanı yöntemi

CFT, MP enfeksiyonunu tespit etmek için standart yöntemdir. Esas olarak erken IgM yanıtlarını saptar ve IgG'ye duyarsızdır. Bununla birlikte, bu yöntemin genel duyarlılığı ve özgüllüğü zayıftır ve antikor tipini ayırt edemez (Wu *et al.* 2017). Testte kullanılan lipid antijeni insan dokularında ve bazı bakterilerde bulunur, ancak çapraz reaksiyona ve yanlış pozitif sonuçlara eğilimli olduğu için klinik olarak nadiren kullanılır. Serum IgM antikorunun titresini saptamak için CFT kullanıldığında, duyarlılık yalnızca %58,8'dir (Loens *et al*. 2010). PA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü CFT'ninkinden önemli ölçüde daha iyidir. Bu nedenle, PA testi bazı ülkelerde klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. PA testi ile elde edilen pozitif oran, yüksek bir tanısal değere sahiptir, ancak CFT'ye benzer şekilde, bu test antikor tipini ayırt edemez. PA titresi ne kadar yüksekse, pozitif IgM olasılığı o kadar yüksektir, ancak PA titresi, pozitif veya negatif IgG ile anlamlı bir şekilde ilişkili değildir. PA testi, teşhis standardı olarak 1:80 veya 1:160'lık bir antikor titresi aldığında, PCR sonuçlarıyla iyi bir tutarlılığa sahiptir. Önceki bir çalışma, çiftlenmiş serumu saptamak için PA testinin kullanılmasının MP enfeksiyonunun teşhisi için bir temel oluşturabileceğini bildirmiştir (Silvia *et al.* 2011).

ELISA, Çin'deki MP enfeksiyonunun teşhisi için mevcut serolojik testte yaygın olarak kullanılan yöntemdir. IgM ve IgG'yi ayrı ayrı tespit edebilir, duyarlılık ve özgüllük yüksek seviyeye ulaşabilir. Pek çok ticari kit mevcuttur, ancak büyük ölçekli standart klinik araştırma değerlendirmeleri eksiktir ve bu kitlerden yalnızca birkaçı ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Altın standart olarak gerçek zamanlı kantitatif PCR ile 12 ticari kitin duyarlılığını ve özgüllüğünü karşılaştırdı ve en yüksek duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla %77 ve %92 olduğunu ve en kötü duyarlılığın yalnızca %35 olduğunu buldu (Beersma *et al.* 2005). Ticari kitlerin MP enfeksiyonunu tespit etme hassasiyeti, hastanın yaşı, laboratuvar donanımının durumu, laboratuvar personelinin tekniği, örnek toplama süresi, akut toplama süresi ve iyileşme sırasında eşleştirilmiş serum gibi faktörlerden etkilenir. Düşük kaliteli ticari mal kitleri, tek tip olmayan tanı kriterlerine neden olabilir. Bu nedenle, kalitelerini yeniden değerlendirmek için büyük ölçekli klinik deneyler yürütülür, tek tip tanı kriterleri

belirlenir ve MP enfeksiyonunu teşhis etmek ve tedavi etmek için uygun saptama reaktifleri seçilir.

Soğuk aglütinasyon (CA) testi, MP enfeksiyonunu yaklaşık %50 pozitif tespit oranıyla teşhis etmek için yaygın bir yöntemdir. Adenovirüs, sitomegalovirüs ve EB virüsünün neden olduğu enfeksiyonlar, serumla yoğunlaştırılmış aglütinin üretimini de indükleyebilir. CA testi, spesifik olmayan bir tanıdır ve şu anda sadece MP enfeksiyonu için referans görevi görür.

2.3.2 Metodolojik değerlendirme

Seruma özgü antikor IgM genellikle MP enfeksiyonundan 7 ile 14 gün sonra ortaya çıkar ve birkaç ay sürebilen 3 ile 4 hafta arasında pik yapar (Loens *et al*. 2010). IgM antikoru immün tepkisi hızlıdır ve bu nedenle erken teşhis için bir gösterge olarak kullanılabilir. Akut fazda, serumda tespit edilen IgM yeni bir enfeksiyon olarak kabul edilir. MP'den bağışıklık tepkisine kadar vücudun enfekte olması belirli bir zaman alır. Kan örnekleme süresinin test sonuçları üzerinde büyük etkisi vardır. Serum numuneleri çok erken toplandığında ve IgM değişiklikleri tespit edilemediğinde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. MP enfeksiyonunun teşhisi için IgM antikor titresini tespit etmek için, akut fazda pozitif serum antikor titresi tespit oranı %14 ile %45 arasındadır, oysa akut fazda %39-88'e yükseltilebilir. MP enfeksiyonunun teşhisi için IgG antikor titresini tespit etmek için, akut fazda pozitif serum antikor titresi tespit oranı %39 ile %45 arasında iken, akut fazda %73-82'ye yükseltilebilir (Talkington *et al.* 2004).

MP ile enfekte çocuklar arasındaki IgM seviyeleri, sağlıklı çocuklardakinden anlamlı derecede yüksektir, ortaokul döneminde zirve yapar, yaşla birlikte düşer ve sadece yetişkinlikte IgG üretebilir. Bu gözlem, çocukluk çağı MP enfeksiyonu için IgM antikor düzeyinin tanısal değerini artırabilir, bu da yetişkin enfeksiyonlarının tanıya zayıf duyarlılığını gösterir. Beersma vd. (2005) duyarlılığı yüksek olan ve sadece IgM antikor seviyesini tespit etmek için kullanılabilen çocukluk çağı MP enfeksiyonunun teşhisi için FDA onaylı ImmunoCard kitini kullandı. Tek başına IgM antikor seviyesi, çocuklarda MP enfeksiyonunu teşhis etmek için de kullanılabilir. MP ile enfekte olmuş

yetişkinlerin yaklaşık %20'sinin IgM antikor titrelerinde bir artış göstermediğini ve tek başına IgM'nin yetişkinlerde MP enfeksiyonunun teşhisinde çocuklara göre daha az etkili olduğunu bildirdi (Watkins-Riedel *et al*. 2001). Spesifik IgG, vücutta daha yavaş bir artış hızı ve daha uzun süre (4 yıla kadar) ile, genellikle 4. haftadan 6. haftaya kadar pik yapan IgM'den daha geçtir.

IgM antikorlarının immünolojik özellikleri nedeniyle, yetişkinler için IgM tespiti hatalı bir tanıya neden olabilir. Şu anda Çin, MP enfeksiyonunun teşhisini doğrulamak için IgG ve IgM antikor seviyelerinin eşzamanlı tespitini benimsemiştir.

Spesifik IgA üretim süresi IgM'ninkine benzerdir ve yetişkinlerde, özellikle yaşlılarda daha yüksektir. Artan IgA antikor seviyeleri, akut MP enfeksiyonunun önemli bir göstergesi olabilir. IgM, IgM'den daha hızlıdır ve IgM üretmeyen bazı yetişkin MP'lerdeki enfeksiyonlar için tamamlayıcı bir referans görevi görebilir. Yaşlı insanlar MP ile enfekte olduğunda, yüksek IgA antikor titreleri tanıya daha elverişli olabilir. Serolojik testleri gerçekleştirmek için IgA antikor titrelerinin kullanılması, MP enfeksiyonu olan kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut alevlenmesi olan hastalarda genellikle daha güvenilirdir (Lieberman *et al*. 2002). Serum antikorlarının immünolojik özellikleri göz önüne alındığında, MP enfeksiyonu için serolojik testin belirli sınırlamaları vardır. Tek serodiagnostik MP enfeksiyonu, yeni ve hızlı bir serum diagnostik (enzim immunoassay) tekniğiyle bile daha az duyarlıdır.

Serolojik testin duyarlılığı da moleküler biyolojik tanıdan oldukça düşüktür. Klinik olarak teşhis edilmiş MP enfeksiyonları genellikle 2 haftada bir toplanması gereken eşleştirilmiş serumun eşzamanlı tespitini gerektirir. Bu yaklaşım epidemiyolojik araştırmalar için geçerlidir ancak erken ve hızlı tanı için geçerli değildir. Tayvan literatürüne göre, klinik olarak eşleştirilmiş serum toplama oranı %10'dan azdır (Chang *et al.* 2014). Özetle, erken MP enfeksiyonunun hızlı teşhisi için serolojik tanı bir yöntem olarak kullanılmamalıdır.

2.4 Moleküler Biyolojik Tanı

Moleküler biyolojik yöntem, yüksek duyarlılık ve özgüllükle erken ve hızlı tanıya izin verir. Yaygın olarak kullanılan deneysel yöntemler, geleneksel PZR, yuvalanmış PZR, gerçek zamanlı kantitatif PZR, nükleik asit sekans tabanlı amplifikasyon (NASBA), döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) teknolojisi ve RNA eşzamanlı amplifikasyonu ve testidir (SAT).

Bu deneysel yöntemlerin temel ilkeleri temelinde, yerli ve yabancı bilim adamları, aynı anda birden fazla patojeni tespit edebilen bir kompozit teknoloji geliştirdiler. Deneyde sıklıkla amplifiye edilen hedef genler arasında P1 protein kodlama geni, 16S rRNA, kart geni, ATPase geni vb. bulunur. Mevcut klinik örnek türleri, faringeal swab, boğaz swabı, balgam numunesi, alveolar lavaj sıvısı, serum, tam kan, ve beyin omurilik sıvısıdır. Yerli ve yabancı bilim adamları, MP enfeksiyonunu farklı laboratuvar koşulları, deneysel amaçlar ve araştırma yönleri altında teşhis etmek için çeşitli yöntemler kullandılar.

Moleküler biyolojik yöntem, MP enfeksiyonunun akut fazında yararlı olmasına rağmen, sağlıklı bir popülasyonda MP taşıma oranı %0,1 ila 13,5 arasında değişmektedir ve üst solunum yolunda DNA 7 hafta ve 7 ay boyunca mevcut olabilir (Waites et al. 2012). Mp DNA moleküler biyoloji ile tespit edilse bile, MP enfeksiyonu veya MP taşıyıcı olarak teşhis edilemez. Tanı, klinik semptomlar ve diğer teşhis yöntemleri ile birlikte yapılmalıdır. CAP'de MP enfeksiyon oranını teşhis etmek için boğaz swabını ve alveolar lavaj sıvısını saptamak için PZR kullandılar ve çoğu çalışmada bildirilen %10,0 - 30,0'dan daha yüksek olan sırasıyla %48,5 ve 40,9 pozitif oranlar elde ettiler. Bu fenomen, sağlıklı insanların asemptomatik taşınmasından veya enfeksiyondan sonra mp DNA'nın kalıcılığından kaynaklanabilir (Saraya et al. 2014).

Tek başına PZR sonucuna dayalı bir MP enfeksiyonu teşhisi yanlış pozitif sonuçlar üretebilir ve aşırı teşhise neden olabilir. Şu anda, laboratuvarlar MP enfeksiyonunu saptamak için kendi yöntemlerini kullanmaktadır, ancak laboratuvar tanı yönteminin değerlendirilmesini zorlaştıran standart bir yöntem geliştirilmeyi beklemektedir. Üç

laboratuvarda MP enfeksiyonunu tespit etmek için aynı yöntemi kullandı. Üç laboratuvar deneyim ve deneysel koşullar açısından karşılaştırılabilir olmasına rağmen, sonuçlar hala tutarsızdı. Bu fenomen, tutarsız tanı kriterlerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, çok merkezli deneyler yapılmalı ve en uygun tanı yöntemini ve laboratuvar koşulunu bulmak için deneysel yöntemler değerlendirilmelidir.

Ayrıca, MP enfeksiyonunun teşhisi için bir standart oluşturulmalıdır. Solunum örneklerine dayalı yuvalanmış PZR, MP enfeksiyonunun hızlı teşhisi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bununla birlikte, birçok faktör, farklı bireylerde PCR ile MP enfeksiyonunun teşhisini etkiler. Bu faktörler arasında hastanın yaşı, semptomlar arasındaki aralık, örnek toplama zamanı, örnek toplama yöntemi, PZR'nin hedef geni ve deneycinin beceri düzeyi yer alır. 3 yaşından küçük hastalarda MP enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkisi olgunlaşmamış ve moleküler biyolojik tanı serolojik tanıdan daha doğru olabilir. Ek olarak, farklı hastalık dönemleri, farklı bağışıklık durumları ve bulaşıcı bakteri miktarlarıyla sonuçlanır. Farklı teşhis yöntemleri de teşhisin doğruluğunu etkiler. Hastalığın erken aşamalarında, kültür ve nükleik asit amplifikasyonu, vücudun bağışıklık tepkisi için gereken süre nedeniyle arzu edilen teşhis yöntemleridir. Daha sonraki aşamalarda, hava yolundaki düşük MP yükü nedeniyle serolojik tanı tercih edilebilir. Bazı bilim adamları hastalığın erken evrelerinde kültür ve nükleik asit amplifikasyonunun ve hastalığın sonraki aşamalarında serolojik testin kullanılmasını önermektedir (Thurman et al. 2009, Qu et al. 2013).

Çoğu çalışmada, toplum kökenli pnömoni vakalarının %10-30'u *Mycoplasma pneumoniae*'ye bağlıdır. Bu vakalar, *M. pneumoniae* enfeksiyonlarının %10'undan azını temsil eder. Çoğu hasta trakeobronşit veya üst solunum yolu hastalığı geliştirir ve enfeksiyonların yaklaşık %15'i asemptomatik kalır (Lieberman et al. 1996, Foy 1993).

M. pneumoniae pneumonia, klasik olarak atipik pnömoni olarak adlandırılır ve baş ağrısı, miyalji, boğaz ağrısı ve başlangıçta kuru öksürük ile ilişkili tedrici başlangıçlı bir hastalık olarak kendini gösterir. Lökosit sayısı genellikle normaldir veya sadece orta

derecede yüksektir. Bununla birlikte, bu belirti ve semptomlar sıklıkla mikoplazma pnömonisi ile ilişkilendirilse de, belirli bir vakada mutlaka tanısal değeri olmayabilir. Son çalışmalar, klinik ve laboratuvar bulgularının mikoplazma pnömonisi ile diğer patojenlerin neden olduğu pnömoniyi ayırt etmede yetersiz olduğunu doğrulamıştır. Bu nedenle, doğru etiyolojik tanı büyük ölçüde laboratuvar tanısına bağlıdır (Clyde 1993, Principi et al. 2001). *M. pneumoniae* pneumonia en çok çocuklar ve genç yetişkinlerde yaygındır ve küçük çocuklar en yüksek atak oranlarını gösterir. Aksine, ajan yaşlılarda nadiren görülmektedir. *M. pneumoniae* enfeksiyonu salgınları her 3-7 yılda bir ortaya çıkar. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda birkaç çalışmanın düşük mikoplazma pnömonisi insidansı bulması dikkate değerdir. Bununla birlikte, bağışıklık fonksiyonu bozulmuş hastalarda şiddetli mikoplazma pnömonisi vakaları hakkında bazı raporlar yayınlanmıştır. Bugüne kadar, *M. pneumoniae* pneumonia için hiçbir bireysel risk faktörü bulunamamıştır.

Mikoplazma teşhisinin faydası bu nedenle tanımlanmış hasta grupları ile sınırlı değildir. Bununla birlikte, klinik olarak şiddetli pnömonisi olan hastalar, özellikle β-laktam antibiyotiklerle tedavi başarısızlıklarından sonra, büyük olasılıkla kapsamlı mikoplazma teşhisi ve ardından yeterli antimikrobiyal tedaviden yararlanacaklardır (Tarp et al. 1999, Perez and Leigh 1991, Jensen et al. 1994).

M. pneumoniae pneumonia, yeterli antimikrobiyal tedavinin olmadığı vakalarda bile genellikle iyi huylu bir sonuçla karakterizedir. Yeterli tedavinin hastalığın seyrini kısaltma açısından faydalı etkisi gösterilmiştir, ancak uyumsuz bulgular da yayınlanmıştır. Mikrobiyolojik olarak kanıtlanmış *M. pneumoniae* pneumonia vakalarında yeterli tedavinin endike olduğu güncel geleneksel görüştür. Mevcut terapötik seçenekler arasında özellikle makrolidler, doksisiklin ve daha yeni kinolonlar, ör. levofloksasin ve moksifloksasin, patojen ise hücre duvarına etki eden antimikrobiyal maddelere, örn. β-laktam antibiyotikler yer alır (Macfarlane et al. 2001, Taylor-Robinson and Bébéar 1997).

M. pneumoniae enfeksiyonunun ekstrapulmoner belirtileri, solunum yolu hastalığından daha az sıklıkta görülür, ancak çoğu zaman yaşamı tehdit edicidir. Nörolojik ve

kardiyak tutulum hastanede yatan hastaların sırasıyla %6-7'sinde ve 5'e varan oranlarında görülür. Ayrıca eklemler ve kırmızı kan hücreleri etkilenebilir. Bu derleme, moleküler yaklaşımlara vurgu yaparak *M. pneumoniae* teşhisinin mevcut durumunu özetlemektedir. Rutin teşhis ve araştırma amaçları için farklı yöntemlerin değeri tartışılır (Davis et al. 1988).

PZR ilk olarak 1989'da Bernet vd. (1989) tarafından *M. pneumoniae* teşhisi için uygulanmıştır. İlk primer seti ATPase operon geninden seçildi ve 144 bp'lik bir fragmanın amplifikasyonunu sağladı. P1 proteinini ve 16S rRNA'yı kodlayan genleri hedefleyen birkaç ek primer sekansı şimdi yapılandırılmıştır. İkinci gen yüksek oranda korunmuş olmasına rağmen, 16S rDNA'nın V2 ve V3 bölgeleri, *M. pneumoniae*'nin spesifik tespiti için yeterli türler arası farklılıklar sergilemektedir. Çapraz reaksiyonlar büyük olasılıkla *M. genitalium* genomunda meydana gelir. 16S rDNA ayrıca cins seviyesinde, örn. *Mycoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma* ve *Acholeplasma* türlerinin çoğunun tek bir testle saptanmasına imkan sağlar. Bu uygulama, hücre kültürlerini mikoplazma kontaminasyonu açısından taramak için kullanışlıdır. Bununla birlikte, *M. pneumoniae* hücre kültürü kontaminantı olarak nadiren görülür (Van Kuppeveld *et al.*1992). PZR'nin amplifikasyona dayalı olmayan yöntemlere kıyasla temel avantajı, üstün hassasiyettir. Tek adımlı PCR tahlilleri genellikle numunenin mililitresi başına 102-103 genom kopyası saptama seviyesine sahiptir.

Hassasiyet, bir PCR ürününün ikinci bir primer setiyle yeniden güçlendirilmesini içeren yuvalanmış PCR ile artırılabilir. DNA seyreltme deneyleri, bu yöntemin kabaca 10-100 organizmaya karşılık gelen 30-100 fg DNA'nın saptanmasını sağladığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, yuvalanmış PZR uygulaması duyarlılıkta 102 kat artışa neden olabilir. Bununla birlikte, klinik örnekler incelendiğinde, *M. pneumoniae* hücrelerinin konglomeralar oluşturma eğilimi, ultrasensitif tespit için bir sınırlamadır.

Bu nedenle, 250 genom kopyası/mL'den daha düşük bir tespit seviyesinin elde edilemeyebileceği varsayılmıştır. Taşınma kontaminasyonu, PZR teşhisinde önemli bir sorundur. Bu özellikle yuvalanmış PCR için geçerlidir çünkü aerosol oluşturan PZR ürünlerinin ikinci çalışma hazırlanırken kullanılması gerekir. PZR'nin geliştirilmesinden

kısa bir süre sonra, yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için kılavuzlar geliştirildi. Bu tür tavsiyelerin uygulanmasıyla, iç içe geçmiş PZR için bile kontaminasyon %0,5'in altına düşebilir. *M. pneumoniae* PZR teşhisi için kitler ticari olarak mevcuttur (Van Kuppeveld *et al.* 1994).

PZR ürünlerinin hibridizasyonunun, jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile analize kıyasla genellikle PZR'nin duyarlılığını artırdığı düşünülmektedir, ancak uyumsuz bulgular da yayınlanmıştır. Uygulanan PZR'nin tespit seviyesi belirlendiyse, numunedeki mikoplazma yükünün yarı kantitatif bir değerlendirmesi, ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin dilüsyonları test edilerek elde edilebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, akut *M. pneumoniae* enfeksiyonu olan hastaların, iyileşme dönemindeki hastalara göre solunum sekresyonlarında daha fazla miktarda patojen barındırdığını gösterdiğinden, bu tür kaba bir ölçüm yararlı olabilir. PZR'nin özgüllüğü, primer seçimine ve reaksiyonun sertliğine bağlıdır. Optimize edilmiş koşullar altında, *M. pneumoniae*'nin PZR ile saptanmasının %100 özgüllük sağladığı gösterilmiştir (Dorigo-Zetsma *et al.* 1999).

Gelişmiş in vitro teknolojiye rağmen, PZR tek başına *M. pneumoniae* tarafından solunum yolu enfeksiyonlarının teşhisi için her zaman yeterli değildir. Birkaç çalışma, mikoplazma pnömonisi olan hastalarda antikor yanıtı ile pozitif PZR sonuçları arasında zayıf bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Tjhie vd. Hastaların %88,1'inde uyumlu PZR ve MAG sonuçları bildirmişlerdir. Skakni vd. (1992) tarafından %72,4'lük bir korelasyon rapor edilmiştir. *M. pneumoniae'ye* karşı hem IgM hem de IgG yanıtlarını ELISA ile belirleyen Waris ve arkadaşları, pediatrik mikoplazma pnömonisi vakalarının yalnızca %50'sinde pozitif bir PZR sonucu elde etti. Kültür teknikleri uygulandığında karşılaştırılabilir gözlemler yapılmıştır. Kenny vd. diğer yaklaşım referans olarak kabul edildiğinde, sırasıyla seroloji ve kültürün %53 ve 64 hassasiyetini bulmuşlardır. Benzer şekilde, pozitif mikoplazma kültürü olan hastaların sadece %58'inin CF antikor titresinde dört kat veya daha fazla artış gösterdiği gösterilmiştir (Grayston *et al.*1969).

Antikor yanıtı olmayan hastaların solunum sekresyonlarında *M. pneumoniae'nin* saptanması için birkaç açıklama vardır. En önemlisi, solunum yolundaki patojenin varlığı mutlaka klinik semptomlarla ilişkili değildir. Gnarpe vd. mevcut epidemiyolojik duruma bağlı olarak sağlıklı yetişkinlerin %5,1-13,5'inin organizmayı boğazda barındırdığını bulmuşlardır. Bu veriler, patojenin boğaz sürüntülerinden izole edilmesiyle elde edildi. *M. pneumoniae'nin* geçici asemptomatik taşınması, patojenin hastalıktan sonra kalıcılığından ve kuluçka dönemi boyunca enfeksiyonlardan kaynaklanır. Bu bağlamda, *M. pneumoniae* solunum yolu hastalıklarında inkübasyon süresinin yaklaşık 3 hafta olduğuna dikkat etmek önemlidir. Bununla birlikte, semptomların başlamasının nedensel olarak tanısal antikor seviyelerinin ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur. Ayrıca, hastalığın erken evrelerinde tanısal antikor tepkisi olmazken, solunum sekresyonlarında *M. pneumoniae* saptanabilir.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, tanısal antikor yanıtı gözlenemez. Asemptomatik enfeksiyonlarda antikor titresinde tanısal bir artışın düzenli olarak meydana gelip gelmediği şu anda bilinmemektedir. Bu değerlendirmelerin bir sonucu olarak, solunum örneklerinde *M. pneumoniae* saptanması, belirli bir pnömoni atağında patojenin nedensel rolünün mutlaka göstergesi olmayabilir. Bununla birlikte, pnömoninin klinik kanıtı ve pozitif bir PCR sonucu, hastalığın mikoplazmal etiyolojisine işaret eder ve antimikoplazma tedavisi için bir göstergeyi temsil eder.

RNA amplifikasyon teknikleri de *M. pneumoniae* teşhisi açısından umut vericidir. RNA tespitinin avantajı, bakteri hücresi başına çok sayıda rRNA kopyası (> 103) olmasından kaynaklanan yüksek hassasiyettir. RNA in vivo olarak RNazlar tarafından hızla bozunduğu için, bu nükleik asidin tespiti, DNA tespitinden daha çok bir klinik numunede canlı mikoplazmaların göstergesidir. Hem cins hem de tür seviyeleri için 16S rRNA'nın sekanslarını hedefleyen RT - PCR testleri geliştirilmiştir. Yakın zamanda *M. pneumoniae*'nin ve sekiz ek solunum patojeninin saptanması için tek tüplü multipleks RT-PCR geliştirilmiştir. Diğer enfeksiyöz ajanların saptanmasında faydalı oldukları gösterilmiş olmasına rağmen, mikoplazma teşhisine henüz dahil edilmemiş RNA amplifikasyon teknikleri de vardır. *Chlamydia trachomatis* ve *Mycobacterium*

tuberculosis tespiti için ticari olarak mevcut olan transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) testleri mikoplazma teşhisini iyileştirebilir (Pasternack *et al.* 1997, Miller *et al.* 1994).

2.5 Moleküler Biyolojik Tanı Yöntemi

2.5.1 Yuvalanmış polimeraz zincir reaksiyonu

Geleneksel PZR ile karşılaştırıldığında, yuvalanmış PZR reaksiyon sistemi iki primer içerir. İlk amplifikasyon bir hata parçası oluştursa bile, ikinci kez yanlış fragmanda primer eşleşmesi ve amplifikasyon olasılığı son derece düşüktür ve bu nedenle yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Üç laboratuvarda yuvalanmış geçmiş PZR ile tespit edilen MP enfeksiyonunun duyarlılığı %87,2 ile 97,4 arasında değişmekte ve özgüllük %89,2 ile 97,4 arasında değişmektedir. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, MP'nin erken ve hızlı teşhisi için bir referans sağlayabilir (Ursi *et al*. 2003).

2.5.2 Real-time quantitative PZR

Gerçek zamanlı kantitatif PZR, PZR ürünlerini etiketlemek ve izlemek için bir floresan boya veya floresan etiketli spesifik bir probun kullanılmasını içeren yeni bir kantitatif test teknolojisidir. Reaksiyon süreci gerçek zamanlı olarak izlenir ve ürünler ilgili yazılıma göre analiz edilir; son olarak, test edilecek örnek şablonun başlangıç konsantrasyonu hesaplanır. Geleneksel PZR ile karşılaştırıldığında, gerçek zamanlı kantitatif PZR daha yüksek bir hassasiyete sahiptir ve erken teşhis için kullanılabilen ve hastalık tedavisinin prognozu ve sonucu için veri sağlayan kantitatif analiz için kullanılabilir. Eşleştirilmiş serum IgG'deki antikor titresi değişikliği altın standart olarak alındığında, gerçek zamanlı kantitatif PZR'nin duyarlılığı %81,8 ve özgüllük %98,6'dır. Akut fazdaki IgM antikor titresi değiştiğinde, gerçek zamanlı kantitatif PZR'nin duyarlılığı %91,7'dir. Bu nedenle gerçek zamanlı kantitatif PZR, MP enfeksiyonu için tanısal bir araç olarak kullanılabilir. Diğer çalışmalar, numune toplama süresinin gerçek zamanlı kantitatif PZR sonuçları üzerinde bir etkisi olduğunu düşünmüştür. Hastalık

kötüleştikçe, gerçek zamanlı kantitatif PCR ile tespit edilen PZR'nin duyarlılığı da azalır (Guo *et al*. 2016, Medjo *et al.* 2014, Khanna *et al*. 2005).

2.5.3 LAMP teknolojisi

LAMP, son yıllarda geliştirilen yeni bir teknolojidir. Hassasiyeti ve özgüllüğü yüksektir ve sadece basit bir ekipman gerektirir. Sabit sıcaklığın deneysel koşullarının kontrol edilmesi kolaydır ve tabandan ve yerinde incelemelerin ihtiyaçlarını karşılayabilir. LAMP ticari kiti Japonya'da kullanılmıştır ve faringeal sürüntü, FDA onaylı kullanılabilir bir örnektir. Alveolar lavaj sıvısını ve balgamı saptamak ve MP enfeksiyonunu teşhis etmek için LAMP yöntemini kullandı ve tatmin edici sonuçlar elde etti (Ratliff *et al.* 2014). Serolojik tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında, enzim immunoassay, IgM antikor titresini saptamak ve MP enfeksiyonunu teşhis etmek için kullanıldığında, sırasıyla %38,7 ve 76,9 daha yüksek bir duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.

PA yöntemi MP enfeksiyonunu teşhis etmek için kullanıldığında, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %19,4 ve 93,1'dir. MP enfeksiyonunu teşhis etmek için kullanılan LAMP, sırasıyla %96,8 ve 100 duyarlılık ve özgüllük gösterir ve bu, serolojik tanı yöntemindekilerden önemli ölçüde üstündür. Kültürün altın standart olarak alınması, MP enfeksiyonunu saptamak için LAMP kullanıldığında, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %99,0 ve 100'dür. Klinik değerini değerlendirmek ve makul bir ücret standardı oluşturmak için büyük ölçekli standartlaştırılmış bir klinik araştırma yürütülürse, bu durumda MP teşhisi için yeni bir yöntem haline gelmesi beklenir (Thurman *et al*. 2009, Kakuya *et al*. 2014).

2.5.4 NASBA

NASBA, bir çift primer aracılı, tek tip, in vitro spesifik nükleotid sekansları tarafından izotermal olarak amplifiye edilen bir RNA güçlendirici teknik ve enzimatik bir reaksiyondur. Bu yöntemin avantajı, RNA'nın amplifikasyonudur. RNA, DNA'dan daha

az kararlıdır ve daha kolay parçalanır. Amplifiye RNA, patojenlerin canlılığını daha iyi yansıtabilir. NASBA ve gerçek zamanlı kantitatif PCR, MP enfeksiyonunun teşhisi için iyi bir anlaşmaya sahiptir (Templeton *et al*. 2003).

2.5.5 SAT teknolojisi

SAT, MP'yi RNA şablonuna göre algılayan yeni bir teknolojidir. MP'nin insan vücudundaki proliferatif durumunu ve aktivitesini gerçek zamanlı olarak yansıtabilir ve hastalık evrelemesi için referans sağlar.

2.5.6 Bileşik PCR

Aynı reaksiyonda birden fazla primer setiyle birkaç gen fragmanını aynı anda amplifiye etme yöntemine multipleks PCR denir. Bu yöntem aynı anda birkaç mikoplazmayı veya MP'yi ve akciğer hastalıklarına neden olan diğer patojenleri tespit edebilir. Multipleks PCR hibridizasyon yönteminin MP dahil beş tipik pnömoni patojenini sırasıyla %100 ve 98,5 duyarlılık ve özgüllükle eşzamanlı olarak saptayabildiğini bildirdi.

Yazarlar, multipleks PCR hibridizasyonunun MP enfeksiyonunun taranması için bir yöntem olarak alınabileceğine inanmaktadır. Multipleks PCR tespitinin hassasiyetinin tekli PCR tespitinden daha az olduğunu, ancak multipleks PCR tespitinin hassasiyetinin kabul edilebilir olduğunu ve klinik suşun tespit oranını doğrulamak için büyük ölçekli klinik çalışmaların gerekli olduğunu bildirdi (Loens *et al*. 2008).

2.6 Hedef Genin Seçimi

MP enfeksiyonunu tespit etmek için P1 kodlama geninin ve 16S rRNA'nın önemini karşılaştırmak için yuvalanmış PCR yöntemini kullandı. 16S rRNA geninin duyarlılığı ve pozitif oranı (%54,5), P1 protein kodlama geninden (%45,5) daha yüksektir. ABD Atlanta'daki MP salgını salgınında, kart geninin, mp3 geninin ve mp7 geninin

hassasiyetlerinin gerçek zamanlı kantitatif PCR ile test edildiğini bildirdi. Sonuçlar, kart geninin duyarlılığının iki genden daha yüksek olduğunu doğruladı.

2.7 Örnek Seçimi

Hedef gen olarak 16S rRNA kullanarak PCR yöntemini inceledi ve balgam, faringeal sürüntü ve boğaz sürüntü örneklerinde ve MP enfeksiyonu tanısı konmuş mp DNA'sını tespit etti (Räty *et al*. 2005). Pozitif oranlar sırasıyla %69,0, %50,0 ve %37,5 idi. Genel olarak balgam örneği, faringeal ve boğaz swablarından üstündür. Serolojik olarak MP ile enfekte genç insanlar arasında, balgam örneklerinin nazofaringeal sürüntü ve boğaz sürüntülerinden üstün olmasına rağmen, birçok çocuk ve yetişkinin MP enfeksiyonundan sonra balgam olmadığını bulmuşlardır. Klinik uygulamaya dayalı olarak, nazofarengeal ve boğaz sürüntüleri örnek toplama açısından balgamdan üstündür. Nazofaringeal sürüntü ve laringeal sürüntü çubuğunun duyarlılığı ve özgüllüğünün eşit olduğunu düşünmüşlerdir. Her açıdan, nazofaringeal ve boğaz sürüntülerinin eşzamanlı tespiti teşhis oranını artırabilir (Winchell *et al*. 2008).

MP enfeksiyonunun teşhisine uygun örnek tiplerini belirlemek için boğaz sürüntüsündeki ve alveolar lavaj sıvısındaki DNA içeriğini tespit etmek için yuvalanmış PZR yöntemini kullandı. Boğaz sürüntüsünün duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %78,6 ve 63,4 iken, alveolar lavaj sıvısınınki sırasıyla %70,3 ve 58,7'dir. Ekonomik faktörler, klinik önem ve çocukların yaralanma derecesi göz önüne alındığında, boğaz sürüntüsünün MP enfeksiyonu tanısı için alveolar lavaja göre daha uygun olduğu sonucuna varmışlardır (Xu *et al*. 2012).

2.8 Doğrudan Antijen Tespiti ve Nükleik Asit Hibridizasyonu

Doğrudan antijen tespiti için tahliller, büyük ölçüde amplifikasyona dayalı tekniklerle değiştirilmiştir. Bu testler yaklaşık 10^4 CFU/mL duyarlılık sağlar. Doğrudan antijen tespiti için ELISA kitleri ticari olarak mevcuttur (Virion, Rüschlikon, İsviçre). Bu tanısal yaklaşım, akciğer dışı belirtilerin teşhisi için önerilmese de, PCR ekipmanı

mevcut değilse solunum sekresyonlarında *M. pneumoniae*'nin saptanması için uygun bir alternatiftir. Patojenin doğrudan boyanması için monoklonal antikorlar detaylandırılmıştır, ancak bu yöntemin zayıf duyarlılığı vardır. Bununla birlikte, immün peroksidaz boyamasıyla, böbrek dokusunda mikoplazma antijeninin varlığı izole bir vakada gösterilmiştir (Andrews *et al.* 1994).

Spesifik problarla hibridizasyon, *M. pneumoniae* teşhisinde ilk moleküler uygulamaydı. Hibridizasyon testleri, antijen tespiti için ELISA testlerine benzer bir hassasiyet sağlar. *M. pneumoniae* için spesifik bir rRNA sekansına etiketli içeren bir DNA probu, PZR'nin yaygın olarak bulunmasından önce yaygın olarak kullanıldı. Bu testin değerlendirilmesi, kültür ve seroloji ile çözüldüğünde balgam örneklerinde mikoplazma tespiti için yüksek derecede duyarlılık (0,95) ve özgüllük (0,85) göstermiştir. Bununla birlikte, bu test, boğaz sürüntülerinde mikoplazma tespiti için sınırlı değere sahiptir. Genel-Prob hızlı sistem ile *M. pneumoniae* ilk kez beyin parankiminde, yani ölümcül mikoplazma ensefaliti olan bir çocukta tespit edilmiştir. Hibridizasyon deneyleri de büyük ölçüde PZR ve ilgili yöntemler ile değiştirilmiştir. Bunun nedeni, amplifikasyon bazlı testlerin daha yüksek duyarlılığı ve ayrıca radyoaktif olarak etiketlenmiş problar söz konusu ise uygunsuz kullanım prosedürleridir (Launes *et al.* 1997).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipmanlar ve aletler

Bu çalışmada kullanılan ekipmanlar ve gereçler kaynaklarıyla birlikte aşağıda Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve araçlar, şirketleri ve menşeileri

No.	Ekipmanın / enstrümanın adı	Firma / ülke
1	Otoklav	Arnreold and Sories / Birleşik krallık
2	Terazi	Mettler / Almanya
3	Santrifüj	Hettich / Japonya
4	Dijital kamera	Canon / Japonya
5	Damıtıcı	GFL / Almanya
6	Elektroforez güç kaynağı	ATTO / Japonya
7	Eppendorf tezgah santrifüjü	Hettich / Japonya
8	laminer akış başlığı	Fayhaa / Çin
9	Mikropipet (P10-P1000)	Human / Almanya
10	Mikroskop	Olympus / Japan
11	Mikrowave	White-westing house / ABD
12	Nanodrop cihazı	Bionner / Kore
13	Normal buzdolabı	Sharp / Japonya
14	PCR cihazı	Applied Biosystem / ABD
15	Termal manyetik karıştırıcısı	Dragonlab / Çin
16	Ultra viyole ışık transillüminatörü	Vilberlourmat / Italya
17	vorteks	Genien / ABD
18	Su havuzu	Memmert / Almanya

3.1.2 Kimyasallar

Bu çalışmanın prosedürlerinde kullanılan kimyasallar ve kaynakları aşağıda Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, şirketleri ve menşeileri

No.	Kimyasalın / Çözeltinin Adı	Firma/ Ülke
1	Agaroz	Promega/ ABD
2	DNA merdiveni (100bp)	Promega/ ABD
3	Etidyum bromür	Geneaid/ Kore
4	Yükleme Boyası	Promega/ ABD
5	Master mix	Promega/ ABD
6	Nükleaz içermeyen su	Promega/ ABD
7	Primerler	Alpha DNA/ kanada
8	TBE 10x	Promega/ ABD

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler aşağıda listelenmiştir, Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi.

Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kitler, firmaları ve menşeileri

Kitin adı	Firma / Ülke
DNA-Sorb-b kiti	Sacaci/ Italya

3.1.4 Reaktifler ve çözümler

3.1.4.1 Formaldehit (%40)

Bu reaktif, 60 ml distile suya 40 ml formalin solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır.

3.1.4.2 Etidyum bromür çözeltisi

Bu çözelti, 0,25 g Ethidium bromür boyasının 50 mL distile su içinde çözülmesiyle, nihai konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve opak bir kapta 4 ˚C'de saklandı.

3.2 Metod

3.2.1 Sterilizasyon metodları

Aşağıdaki sterilizasyon yöntemleri (Rutala and Weber 2004) göre kullanılmıştır.

3.2.1.1 Nemli ısı sterilizasyonu

Laboratuvar ekipman ve aletlerinin bir kısmı 121 ºC'de 15P/In2 altında 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.2.1.2 Kuru ısı sterilizasyonu

Cam eşyalar 2 saat boyunca 180 °C'de fırında sterilize edilmiştir.

3.2.2 Çalışma popülasyonu

3.2.2.1 Çalışma hastaları

Çalışma süresince, klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış, yaşları 20-70 arasında değişen 43 kadın ve 57 erkek (Hasta grubu) olmak üzere 100 hasta çalışmaya dahil edildi. Aralık 2020 başından Şubat 2021 sonuna kadar Bağdat Eğitim Hastanesi ve Al-Furat Genel Hastanesi'ne etik ve hastane onayına göre sevk edilen hasta grubundan örnekler toplanmıştır. Her vakanın seçimi, uzmanlar tarafından yapılan radyolojik ve klinik muayene ile belirlendi.

3.2.2.2 Sağlıklı denekler

Örneklerin toplanması için daha önce pnömoni öyküsü olmayan (Kontrol grubu) 19 kadın ve 31 erkeğe dağıtılan elli görünüşte sağlıklı birey seçildi. Hasta grubu ile yaş eşleştirildi.

3.2.2.3 Temel veriler

Hastanın temel veriler için anketi dahil edildi: Yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, klinik öykü, öksürük, ateş, hastalık süresi, şimdiki ve geçmişteki tedavi.

3.2.3 Numune toplama

Balgam örnekleri DNA ekstraksiyonu için kullanıldı; hastalara balgam örneklerinin uygun şekilde toplanması konusunda dikkatli bir şekilde talimat verildi. Sabah erken balgam örnekleri steril kaplarda alındı, hastalara tükürük yerine balgamın uygun şekilde toplanması konusunda dikkatli bir şekilde talimat verildi. Kap, hasta numarası ile etiketlenmiştir.

3.2.4 DNA ekstraksiyonu

Dondurulmuş balgam örnekleri dondurucudan çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelmesine izin verilmiş, her bir örnekten 100 µl'lik bir kısım alınmış ve ticari bir DNA-Sorb-b kiti (Sacaci / İtalya) kullanılarak aşağıdaki protokol gibi DNA ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur:

1. Lizis solüsyonu ve yıkama solüsyonları, buz kristalleri kaybolana kadar 65 ºC'ye kadar ısıtıldı.
2. Ekstraksiyonun negatif kontrolü için bir tüp içeren her numune için steril propilen tüpler (1,5 mi) hazırlanmıştır.

3. Her tüpe üç yüz mikrolitre lizis solüsyonu ilave edildi.
4. Her numuneden yüz mikrolitre uygun tüpe eklendi.
5. Tüpler vortekslandı ve 5 dakika 65 ºC'de inkübe edildi, 10 saniye santrifüjlendi, süpernatan DNA ekstraksiyonu için yeni bir küvete aktarıldı.
6. Sorbent kuvvetlice vortekslandı ve her bir küvete 20 µl ilave edildi.
7. Tüm tüpler 10 saniye vortekslendi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Tüm tüpler 30 saniye boyunca 5000g'de santrifüjlendi, peleti bozmadan her tüpten süpernatantı çıkarmak ve atmak için tıkalı aerosol bariyer uçları olan bir mikropipet kullanıldı.
9. Her tüpe üç yüz mikrolitre yıkama solüsyonu ilave edildi, tüpler kuvvetli bir şekilde vortekslendi ve 8000g'de 30 saniye santrifüjlendi, daha sonra süpernatan çıkarıldı ve her tüpten atıldı.
10. Her tüpe beş yüz mikrolitre yıkama solüsyonu ilave edildi, tüpler kuvvetli bir şekilde vortekslendi ve 8000g'de 30 saniye santrifüjlendi, daha sonra süpernatan çıkarıldı ve her tüpten atıldı.
11. Tüm tüpler açık kapaklı olarak 65 ºC'de 5 dakika inkübe edildi.
12. Her tüpteki pelet 50 µl DNA eluentiyle yeniden süspanse edildi; tüpler periyodik vorteks ile 65 ºC'de 5 dakika inkübe edildi.
13. Tüpler 12000g'de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklandı.

3.2.5 Agaroz jel elektroforezi

Balgam örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra, ekstrakte edilen bu DNA'nın varlığını ve bütünlüğünü doğrulamak için agaroz jel elektroforezi benimsendi.

3.2.5.1 TBE 1x tamponunun hazırlanması

TBE 1x tamponu, TBE 10x tampoden (stok solüsyon olarak) 100 mL bu stok solüsyondan 900 ml damıtılmış suya eklenerek hazırlandı.

3.2.5.2 Agaroz jelin hazırlanması

1. Elli mililitre TBE 1x tamponu bir behere alındı.
2. Tampona 0,5 gm agaroz tozu ilave edildi.
3. Çözelti, tüm jel partikülleri eriyene kadar mikrowave kullanılarak kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
4. Agaroz çözeltisine iki mikrolitre etidyum bromür (5 mg/mL) ilave edildi ve ardından agaroz hafifçe karıştırıldı.
5. Solüsyon 50-60 °C'de soğumaya bırakıldı.

3.2.5.3 Yatay agaroz jelin dökümü

Jel tepsisinin her iki kenarı selofan bant ile kapatıldıktan ve tarak bir kenardan 1 cm uzağa sabitlendikten sonra agaroz solüsyonu jel tepsisine döküldü. Agarozun oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmasına izin verildi. Sabit tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel tepsisi jel tankına yerleştirildi. Tank, tampon jel yüzeyi üzerinde 5 mm'ye ulaşana kadar TBE 1x tamponu ile dolduruldu.

3.2.6 Ekstrakte edilen DNA'nın analizi

Balgam numunesinden ve DNA merdiveninden ekstrakte edilen DNA örnekleri, elektroforez ile çözüldü. 2 µL mavi yükleme boya solüsyonu 6x plus 5 µL ekstrakte edilmiş DNA örnekleri %1 agaroz jele yüklendi ve 70 voltta bir saat çalıştırıldı. Son olarak, ekstrakte edilen DNA bantları, UV transillüminatör üzerinde 350 nm dalga

boyunda görselleştirildi ve ardından jel dokümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.7 Genomik DNA konsantrasyonu ve saflığının tahmini

Septum örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu, numunelerin nükleik asit içeriği 1 µL hacimde ölçülerek Nanodrop spektrofotometre kullanılarak tahmin edildi. DNA, 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon ile ultraviyole ışığı emdi. Bu numunelerin saflığı, 280 nm'deki absorpsiyonla karşılaştırıldığında 260 nm'deki absorpsiyonun fark edilmesiyle saptandı. 260:280 oranı, protein kontaminasyonunun iyi bir göstergesidir, burada 260/280 oranında ~1.8 "nispeten saf" DNA olarak kabul edilir.

3.2.8 Singleplex PCR ile *Mycoplasma pneumoniae*'nin 16S rDNA'sının tespiti

Singleplex PCR, balgam örneklerinden ekstrakte edilmiş DNA örneklerinde *Mycoplasma pneumoniae*'nin 16S rDNA'sını saptamak için kabul edildi.

3.2.8.1 Singleplex PCR primerleri

Primer seçimi

Mycoplasma pneumoniae'nin 16S rDNA'sı için spesifik amplifikasyon verebilen singleplex PCR primerlerini seçmek. Primerler (MPN-F / MPN-R), bu primerlerin adı ve dizisi aşağıda Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Çizelge 3.4 *Mycoplasma pneumoniae* adı ve dizisi

Primer'in adı	**Primer'in dizisi** 5'-3'	**Amplikon'nun boyutu**
MPN-F	AAGGACCTGCAAGGGTTCGT	277 bp
MPN-R	CTCTAGCCATTACCTGCTAA	

Primerlerin hazırlanması

Primerler, Alpha-DNA firması tarafından farklı pikomol konsantrasyonlarına sahip liyofilize ürünler olarak sağlandı. Primerlerin hazırlanması için, liyofilize primerlere talep edilen hacimde nükleaz içermeyen su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu primer stok solüsyonu elde edilerek Alpha-DNA firmasının protokolü benimsenmiştir.

Primerlerin depolanması

Stoke çözümü: Üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan primerlerin stok solüsyonu -20 ºC'de saklandı.

Çözümün çalışması: Primer stok solüsyonunun tekrar tekrar dondurulup çözülmesini önlemek için uygun konsantrasyonda küçük alikuotlar hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklandı.

3.2.8.2 Singleplex PCR master mix

Mycoplasma pneumoniae'nin 16S rDNA'sının amplifikasyonu için singleplex PCR master mix optimizasyonu, birkaç denemeden sonra gerçekleştirildi; bu nedenle aşağıdaki master mix'ler benimsenmiştir, Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi.

Çizelge 3.5 *Mycoplasma pneumoniae'*nin 16S rDNA'sını saptamak için singleplex PCR ana karışımı

Bileşen	**konsantrasyon**	**Miktar (µl)**
GoTaq Green Master Mix 2X	10 mM Her biri	12
MPN-F	10 µM/ µl	1
MPN-R	10 µM/ µl	1
Nükleaz içermeyen su	-	7
DNA örneği	-	4
Toplam hacim	-	25

3.2.8.3 Singleplex PCR programı

Mycoplasma pneumoniae'nin 16S rDNA'sının amplifikasyonu için singleplex PCR programının optimizasyonu, birkaç denemeden sonra gerçekleştirildi; bu nedenle aşağıdaki programlar benimsenmiştir Çizelge 3.6'de gösterildiği gibi.

Çizelge 3.6 *Mycoplasma pneumoniae'*nin 16S rDNA'sını saptamak için singleplex PCR programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94	1 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	30
Bağlanma	63	1 dk.	
Uzama	72	2 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1
Depolama	4	∞	-

3.2.8.4 Singleplex PCR ürünleri analizi

Mycoplasma pneumoniae'nin 16S rDNA'sının singleplex PCR ürünleri, bölüm (3.2.6)'daki gibi analiz edildi.

3.2.9 *Mycoplasma pneumoniae* β-Globin geninin singleplex PCR ile tespiti

Singleplex PCR, balgam örneklerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinde *Mycoplasma pneumoniae*'nin β-Globin genini saptamak için kabul edildi.

3.2.9.1 Singleplex PCR primerleri

Primer seçimi

Mycoplasma pneumoniae'nin β-Globin geni için spesifik amplifikasyon sağlayabilen singleplex PCR primerlerini seçmek. Primerler (MPG-F / MPG-R) bu primerlerin adı ve dizisi aşağıda Çizelge 3.7'de listelenmiştir.

Çizelge 3.7 *Mycopasma pneumoniae* primerlerinin adı ve dizisi

Primer'in adı	Primer'in dizisi 5'-3'	Amplikon boyutu
MPG-F	ACAGAACTGTGTTCACTAGC	326 bp
MPG-R	CATCAGGAGTGGACAGATCC	

Primerlerin hazırlanması

Primerler, Alpha-DNA firması tarafından farklı pikomol konsantrasyonlarına sahip liyofilize ürünler olarak sağlandı. Primerlerin hazırlanması için, liyofilize primerlere talep edilen hacimde nükleaz içermeyen su ilave edilerek 100 µM konsantrasyonlu primer stok solüsyonu elde edilerek Alpha-DNA firmasının protokolü benimsenmiştir.

Primerlerin depolanması

I. **Stoke çözümü**

Üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan primerlerin stok solüsyonu -20 ºC'de saklandı.

II. **Çözümün çalışması**

Primer stok solüsyonunun tekrar tekrar dondurulup çözülmesini önlemek için, uygun konsantrasyonda küçük alikuotlar hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -20 ºC'de saklandı.

3.2.9.2 Singleplex PCR master mix

Mycoplasma pneumoniae'nin β-Globin geninin amplifikasyonu için singleplex PCR ana karışımının optimizasyonu, birkaç denemeden sonra gerçekleştirildi; bu nedenle aşağıdaki ana karışımlar benimsenmiştir, Çizelge 3.8'de gösterildiği gibi.

Çizelge 3.8 *Mycoplasma pneumoniae*'nin β-Globin genini saptamak için singleplex PCR ana karışımı

Bileşen	**Konsantrasyon**	**Miktar (µl)**
GoTaq Green Master Mix 2X	10 mM Her biri	12
MPG-F	10 µM/ µl	1
MPG-R	10 µM/ µl	1
Nuclease free water	-	7
DNA numunesi	-	4
Toplam hacim	-	25

3.2.9.3 Singleplex PCR programı

Mycoplasma pneumoniae'nin β-Globin geninin amplifikasyonu için singleplex PCR programının optimizasyonu birkaç denemeden sonra gerçekleştirildi; bu nedenle aşağıdaki programlar benimsenmiştir, Çizelge 3.9'de gösterildiği gibi.

Çizelge 3.9 *Mycoplasma pneumoniae'*nin β-Globin genini saptamak için singleplex PCR programı

No.	**Adım**	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**	**Döngü Sayısı**
1	İlk denatürasyon	95	5 dk.	1
2	Denatürasyon	94	30 sn.	35
3	Tavlama	62	30 sn.	
4	Uzatma	72	30 sn.	
5	Son uzatma	72	10 dk.	1
6	Depolamak	4	∞	-

3.2.9.4 Singleplex PCR ürünleri analizi

Mycoplasma pneumoniae'nin β-Globin geninin singleplex PCR ürünleri bölüm (3.2.6)'daki gibi analiz edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Nüfus Çalışma Grupları

Bu çalışmanın Aralık 2020 başından Şubat 2021 sonuna kadar olan döneminde, klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu tanısı konan hastalardan (Hasta grubu) cinsiyete göre ilk önce iki gruba ayrılan toplam 100 balgam örneği toplanmıştır. 57 erkekten oluşan grup toplam hasta sayısının %57'sini, 43 kadından oluşan ikinci grup ise 20-70 yaş aralığındaki toplam hasta sayısının %43'ünü oluşturmuştur. Ayrıca, kontrol grubunun %38'ini oluşturan 19 kadın ve toplam kontrol grubundan %62'sini oluşturan 31 erkek olmak üzere, yaşları 20-70 yaş arasında değişen, görünüşte sağlıklı bireylerden (Kontrol grubu) toplam 40 balgam örneği toplanmıştır.

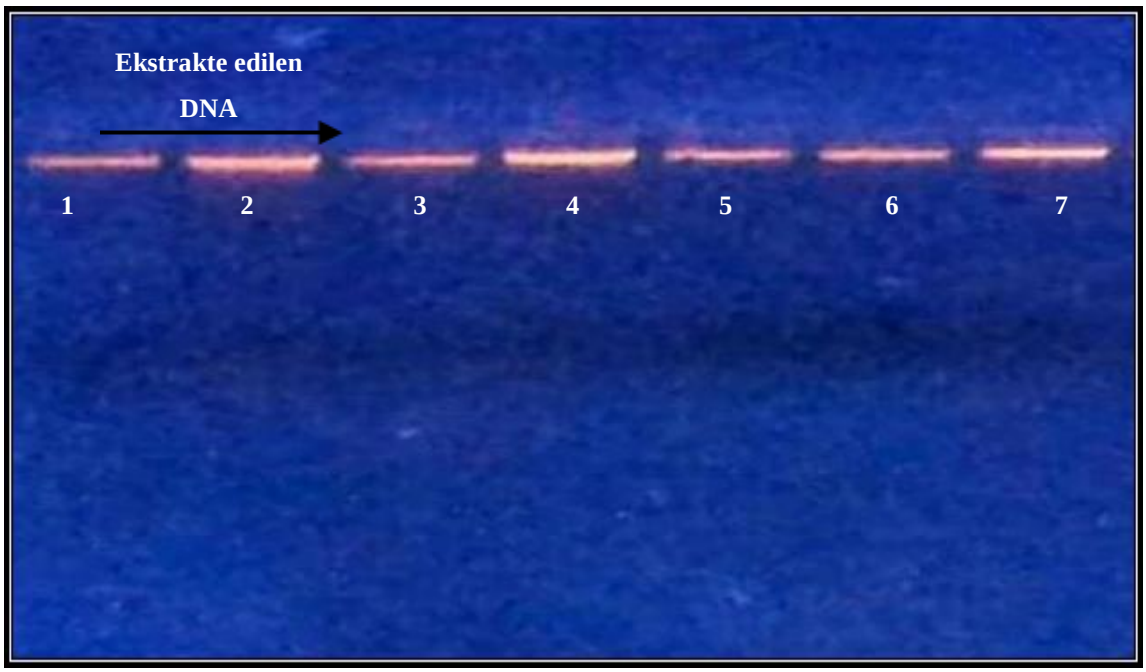
Özetlemek gerekirse, klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu teşhisi konan (Hasta grubu) 100 (%100) hastanın 26'sı (%26) *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu için pozitif sonuçlar gösterdi, 26'sından 16'sı (%61,54) erkektir ve 10'u (%38,46) kadındır. Özetlemek gerekirse, görünüşte sağlıklı 40 (%100) kişiden, 24'sı (%60) erkekti ve 16'ü (%40) kadındı. Sonuçlar, *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonunun hem cinsiyette hem de tüm yaş gruplarında mevcut olduğunu gösterdi.

4.2 DNA ekstraksiyonu

Klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu teşhisi konan hastaların balgam örneklerinden DNA, ticari bir DNA-Sorb-b kiti ile ekstrakte edildi, ekstrakte edilen genomik DNA, jel elektroforezi kullanılarak analiz edildi. Jel elektroforezinin sonuçları, ekstrakte edilen DNA'nın keskin bantlarını gösterdi, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi.

Mevcut çalışmanın sonucu, alkalin liziz, kaynatma ve tuzlama yöntemleri gibi geleneksel DNA ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında DNA için hızlı bir ekstraksiyon yöntemi olarak DNA ekstraksiyon kiti gibi ticari kitlerin önemli kullanımını göstermiştir ve bu bulgu aşağıdaki bulgu ile uyumludur (Shbib and

Soukkarieh 2015). DNA ekstraksiyon kitinin DNA ekstraksiyonu için etkili ve hızlı bir yöntem olarak kullanımına ilgi duyduklarını belirtmişlerdir. Bu, diğer PCR yöntemlerinin hantal ve sıkıcı bir adımı olan fenol-kloroform kullanımını ortadan kaldırarak işleme hızında önemli gelişmeler sağladı.



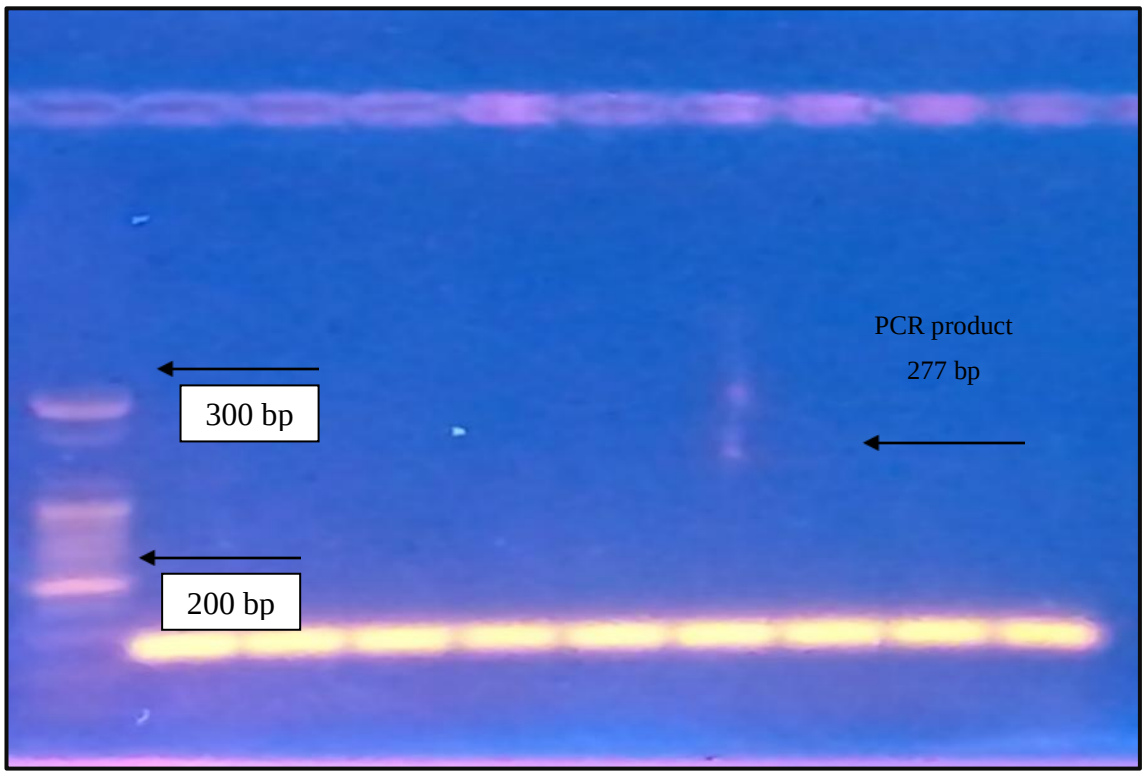
Şekil 4.1 Balgam örneklerinden ekstrakte edilen DNA'nın 6 vol/cm'de 1 saat boyunca 1% agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1-7: Çıkarlan DNA

4.3 *Mycoplasma pneumoniae*'nin 16S rDNA'sının Singleplex PCR İle Tespiti

Bu çalışmada, klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu tanısı konan hastaların balgam örneklerinden alınan DNA, 16S rDNA'yı saptamak için seçilmiştir, bu nedenle, GoTaq-Green master mix ve spesifik primerler kullanılarak 16S rDNA'nın moleküler tespiti için singleplex PCR tekniği kullanılmıştır. Başarılı singleplex PCR reaksiyonunda 277 bp moleküler ağırlıklı 16S rDNA ürünü gözlendi. Bu, başarılı reaksiyonun zorunlu işareti olarak kabul edildi, jel elektroforezi üzerine bandının 100 bp DNA merdiveninin 200-300 bp bantları arasında yer alması bu genin varlığını gösterir, Şekil 4.2'de gösterildiği gibi. Bir diğer önemli hedef ise 16S rRNA veya daha doğrusu rDNA'dır. rDNA dizilerini kullanmanın avantajı, hedefin yüksek derecede korunması ve oldukça değişken bölgelerin varlığından kaynaklanmaktadır (Nour *et al.* 2005). Van Kuppeveld

et al. (1994), klinik örneklerde Mycoplasmapneumoniae'nin tanımlanması için polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) uygunluğunu ve ayrıca enfeksiyon teşhisi için ek bir araç olarak PCR'nin potansiyel kullanımını kanıtlamıştır. Bu çalışma bizim bulgularımızla örtüşmektedir (Van Kuppeveld *et al.* 1994).

Diğer araştırmacılar tarafından gösterildiği gibi, tek adımlı PCR tahlilleri sadece 10–100 pg DNA'yı tespit edebilir. (Daxboeck *et al.* 2003). Ayrıca çalışmamızın sonucu 16S rDNA ile doğrudan PCR'nin solunum yolu örneklerinde *M. pneumoniae*'nin saptanmasında yararlı olabileceğini kanıtlayan Tjhie vb. (1994) ile hemfikirdir. Bunun yanısıra, *M. pneumoniae* solunum yolu enfeksiyonlarının teşhisinde PCR tekniklerinin faydası ve değeri de birkaç çalışma tarafından rapor edilmiştir ((Abele-Horn *et al.* 1998; Ieven *et al.* 1996; Tjhie *et al.* 1994).



Şekil 4.2 *Mycoplasma pneumoniae*'nin singleplex PCR ürününün 7 volt/cm'de 1 saat boyunca %1.5 agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1: 100 bp DNA merdiveni, şerit 2-10: 16S rDNA'nın singleplex PCR ürünü

4.4 *Mycoplasma pneumoniae* B-Globin Geninin Singleplex PCR İle Tespiti

Bu çalışmada, klinik olarak solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış hastaların balgam örneklerinden alınan DNA, β-Globin genini saptamak için seçilmiştir, bu nedenle GoTaq-Green ana karışımı ve spesifik primerler kullanılarak β-Globin geninin moleküler tespiti için singleplex PCR tekniği kullanılmıştır. Human betaglobin gene was included as an internal control to allow assessment of the specimen quality and the nucleic acid extraction as well as the amplification processes.

Başarılı singleplex PCR reaksiyonunda 326 bp moleküler ağırlıklı β-Globin gen ürünü gözlendi. Bu, başarılı reaksiyonun zorunlu işareti olarak kabul edildi, jel elektroforezi üzerine bandının 100 bp DNA merdiveninin 300-400 bp bantları arasında yer alması bu genin varlığını gösterir, Şekil 4.3'te gösterildiği gibi.

Genellikle PCR için ön işlem olarak kullanılan nükleik asit saflaştırması zahmetlidir ve rutin prosedürler için pratik değildir. Basit bir ön işlemden sonra doğrudan klinik numuneler üzerinde gerçekleştirilen bir PCR tercih edilir (Van Kuppeveld *et al.* 1992). PCR ve RT-PCR, saflaştırılmış nükleik asitler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Diğer çalışmaların aksine (Bernet *et al* 1989, Williamson *et al.* 1992, Skakni *et al.* 1992), bunlar inhibitör maddeler içerebileceğinden simüle edilmiş klinik örnekler kullanılmamıştır. Doğrudan PCR'nin duyarlılığı, RT-PCR'ninkiyle aynıydı ve arka plan insan DNA'sının fazlalığından etkilenmedi (Harris and Stephens 1988).

Bu örnekler üzerinde yaptığımız çalışmada, b-globin geni PCR'den sonra bir bant üretti, önemli PCR inhibitör faktörlerinden yoksun oldukları belirlendi. Waring vb. (2001) için önceki çalışma hasta örneklerini değerlendirmek için kullanılan Human beta globin gen PCR'sini gösteren sonucumuzu kanıtladı.



Şekil 4.3 *Mycoplasma pneumoniae*'nin singleplex PCR ürününün 7 volt/cm'de 1 saat boyunca %1.5 agaroz jel kullanılarak jel elektroforezi. Şerit 1: 100 bp DNA merdiveni, şerit 2-7: β-Globin geninin singleplex PCR ürünü

Klinik örneklerin amplifikasyon için uygun olduğundan emin olmak için, hepsi ilk önce β-globin geninin 326-bp'lik bir fragmanını amplifiye ederek bir PCR gerçekleştirerek test edildi. β-globin PCR'nin, spesifik PCR'de amplifiye edilen fragmanla karşılaştırılabilir uzunlukta bir fragmanı büyütmesi önemlidir, çünkü daha küçük fragmanların daha verimli amplifiye olduğu ve DNA'nın bozulmasına karşı daha az duyarlı olduğu bulunmuştur.Negatif, β-globin sonuçları, doğrudan PCR ile örneklerin sadece %5.1'inde (n=5) ve nükleik asitlerin saflaştırılmasından sonra %2'sinde (n numuneler) bulundu; bu, ve tarafından bulunan ,3-globinin amplifikasyonunun %25 başarısızlığının aksinedir. Bu bulgular, farklı klinik örneklerin kullanılması, diğer primerler ile a -globin PCR ve farklı bir ön tedavi gibi çalışmalar arasındaki çeşitli farklılıklar ile açıklanabilir. Doğrudan PCR'deki tüm β-globin negatif numuneler boğaz sürüntüleridir. Negatif bir PCR sonucu, boğaz sürüntü örneklerinde bulunan az miktarda DNA veya inhibisyonun sonucu olabilir. Nükleik asitlerin saflaştırılmasından sonra beş boğaz sürüntü örneğinden üçünde amplifikasyon başarılı oldu, bu da inhibitör faktörlerin ortadan kaldırıldığını gösteriyor.

5 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde edilen bulgular ışığında şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır. *Mycoplasma pneumoniae*'nin Iraklı hastalarda pnömoni vakaları ile anlamlı ilişkisi olduğu bulundu. *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu sonuçları erkek hastalarda kalıcılığı kadın hastalardan daha yüksek olarak ortaya koydu. Mevcut çalışmanın sonuçları, çalışılan hastaların yaş grupları ile *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu insidansı arasında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir. *Mycoplasma pneumoniae*'nin konvansiyonel yöntemlerle teşhisi, temel adımlar olarak kabul edilir, ancak kesinlikle doğru yöntemler değildir. 16S rDNA ve β-Globin geni için spesifik primerler kullanan Singleplex PCR, farklı pnömoni vakalarında *Mycoplasma pneumoniae*'nin tanımlanması için güvenilir ve doğrulayıcı bir tanı yöntemi olabilir.

Bu çalışmadan kullanılan teknikler ve elde edilen sonuçlar ileride yapılacak başka çalışmalara yol gösterebilecektir. Pnömoni ile hastaneye başvuran genç ve yetişkinlerin rutin mikrobiyal araştırmasında *M. pneumoniae* tespitinin onaylanması, Taşıyıcı ve kronik enfeksiyonlardan kaçınmak için pozitif vakaları tamamen eradike edene kadar kullanılması, farklı pnömoni vakaları ile ilişkili *Mycoplasma pneumoniae* tespiti için spesifik ve hızlı yöntem olarak RT-PCR tekniğinin kullanılması , *Mycoplasma pneumoniae* izolatları arasındaki filogenetik ilişkileri incelemek için etkili bir yöntem olarak DNA dizileme tekniğinin kullanılması açısından ve Pnömoni hastalığında bu virülans faktörlerinin etkisini göstermek için *Mycoplasma pneumoniae* virülans faktörlerinin rolünü ortaya çıkarmak için daha fazla çalışma yapılmalıdır. *Mycoplasma pneumoniae*'nin tespiti için moleküler tanı araçları, moleküler programlar ve bilgisayar yazılımlarını içeren bilimsel araştırma olanaklarını uygulamak ve bu mikroorganizmalarla ilgili araştırmalar yapmak açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

Abele-Horn, M., Busch, U., Nitschko, H., Jacobs, E., Bax, R., Pfaff, F., Schaffer, B. and Heesemann, J. 1998. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to Mycoplasma pneumoniae. Journal of Clinical Microbiology, 36: 548-551.

Abele-Horn, M., Busch, U., Nitschko, H., Jacobs, E., Bax, R., Pfaff, f. Schaffer, B. and Heesemann, J. 1998. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to Mycoplasma pneumoniae. J. Clin. Microbiol. 36: 548–551.

Andrews, P. A., Lloyd, C. M., Webb, M. C. and Sacks, S. H. 1994. Acute interstitial nephritis associated with Mycoplasma pneumoniae infection. Nephrology Dialysis Transplantation, 9: 564-566.

Barker, C. E., Sillis, M. and Wreghitt, T. G. 1990. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting Mycoplasma pneumoniae antibody: comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence. Journal of clinical pathology, 43: 163-165.

Barry, J. S., Burge, J. A., Byles, D. B., Morgan, M. S., Bryant, A. E., Bayer, C. R., Huntington, J. D., Stevens, D. L., Fry, L. and Powles, A. V. 2006. Skin and soft tissue infections. Curr. Opin Infect. Dis, 19: 132-138.

Beersma, M. F., Dirven, K., van Dam, A. P., Templeton, K. E., Claas, E. C. and Goossens, H. 2005. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for Mycoplasma pneumoniae-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the gold standard. Journal of Clinical Microbiology, 43: 2277-2285.

Bernet, C., Garret, M., De Barbeyrac, B., Bebear, C. and Bonnet, J. 1989. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 27: 2492-2496.

Chang, H.-Y., Chang, L.-Y., Shao, P.-L., Lee, P.-I., Chen, J.-M., Lee, C.-Y., Lu, C.-Y. and Huang, L. M. 2014. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of Mycoplasma pneumoniae infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia. Journal of Microbiology Immunology and Infection, 47: 137-144.

Clyde, W. A. J. 1993. Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections. Clinical Infectious Diseases. An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 1: 32-6.

Davis, C. P., Cochran, S., Lisse, J., Buck, G., DiNuzzo, A. R., Weber, T. and Reinarz, J. A. 1988. Isolation of Mycoplasma pneumoniae from synovial fluid samples in a patient with pneumonia and polyarthritis. Archives of internal medicine, 148: 969-970.

Daxboeck, F, Krause, R, Wenisch, C. 2003. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniaeinfection. Clin. Microbiol. Infect., 9: 263-273.

Dorigo-Zetsma, J. W., Zaat, S. A., Vriesema, A. J. and Dankert, J. 1999. Demonstration by a nested PCR for Mycoplasma pneumoniae that M. pneumoniae load in the throat is higher in patients hospitalised for M. pneumoniae infection than in non-hospitalised subjects. Journal of medical microbiology, 48: 1115-1122.

Foy, H. M. 1993. Infections caused by Mycoplasma pneumoniae and possible carrier state in different populations of patients. Clinical Infectious Diseases, 17: 37-46.

Gil, J. C., R. L. Cedillo, B. G. Mayagoitia, and M. D. Paz. 1993. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. Annals of allergy. 70: 23-25.

Gotoh, K., Nishimura, N., Ohshima, Y., Arakawa, Y., Hosono, H., Yamamoto, Y., Ozaki, T., Iwata, Y., Nakane, K. and Funahashi, K. 2012. Detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. Journal of Infection and Chemotherapy, 18: 662-667.

Granato, P. A., Poe, L. and Weiner, L. B. 1980. Use of modified New York City medium for growth of Mycoplasma pneumoniae: a preliminary report. American journal of clinical pathology, 73: 702-705.

Grayston, J. T., Foy, H. M. and Kenny, G. E. 1969. The epidemiology of mycoplasma infections of the human respiratory tract. The mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. Appelton-Century-Crofts, 23: 651-682.

Guo, D., Hu, W., Li, D., Li, J., Li, S. and Wu Z. 2016. Establishment of the method for detecting Mycoplasma Pneumoniae through fluorescence quantitative polymerase chain reaction, Inf. Infect. Dis., 29: 52-56

Harris, C. and Stephens, M. 1988. A combined corner and edge detector. In Alvey vision conference, 50: 10-5244.

Hosker, H. S., Tam, J. S., Chan, C. H. and Lai, C. K. 1993. Mycoplasma pneumoniae infection in Hong Kong–clinical and epidemiological features during an epidemic. Respiration, 60: 237-240.

Huang, S., Li, J.-Y., Wu, J., Meng, L. and Shou, C.-C. 2001. Mycoplasma infections and different human carcinomas. World journal of gastroenterology, 7: 266-269.

Ieven, M., Ursi, D., Van Bever, H., Quint, W., Niesters, H. G. M. and Goossens, H. 1996. Detection of Mycoplasma pneumoniae by two polymerase chain reactions and role of M. pneumoniae in acute respiratory tract infections in pediatric patients. J Infect Dis., 173: 1445– 1452.

Jacobs, E. Bennewitz, A. and Bredt, W. 1986. Reaction pattern of human anti-Mycoplasma pneumoniae antibodies in enzyme- linked immunosorbent assays and immunoblotting. J. Clin. Microbiol., 23: 517-22.

Jensen, J. S., Heilmann, C. and Valerius, N. H. 1994. Mycoplasma pneumoniae infection in a child with AIDS. Clinical Infectious Diseases, 19: 207-207.

Kakuya, F., Kinebuchi, T., Fujiyasu, H., Tanaka, R. and Kano, H. 2014. Genetic point-of care diagnosis of M ycoplasma pneumoniae infection using LAMP assay. Pediatrics International, 56: 547-552.

Khanna, M., Fan, J., Pehler-Harrington, K., Waters, C., Douglass, P., Stallock, J., Kehl, S. and Henrickson, K. J. 2005. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae, Legionella pneumophila, Legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. Journal of Clinical Microbiology, 43: 565-571.

Kleemola, M. and Kayhty, H. 1983. Increase in titers of antibodies in patients with purulent meningitis. J. Infect. Dis., 146: 284-8.

Launes, J., Paetau, A., Linnavuori, K. and Iivanaineu, M. 1997. Direct invasion of the brain parenchyma by Mycoplasma pneumoniae. Acta neurologica scandinavica, 95: 374.

Lieberman, D., Lieberman, D., Ben-Yaakov, M., Shmarkov, O., Gelfer, Y., Varshavsky, R., Ohana, B., Lazarovich, Z. and Boldur, I. 2002b. Serological evidence of

Mycoplasma pneumoniae infection in acute exacerbation of COPD. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 44: 1-6.

Lieberman, D., Schlaeffer, F., Lieberman, D., Horowitz, S., Horovitz, O. and Porath, A. 1996a. Mycoplasma pneumoniae community-acquired pneumonia: a review of 101 hospitalized adult patients. Respiration, 63: 261-266.

Loens, K., Beck, T., Ursi, D., Overdijk, M., Sillekens, P., Goossens, H. and Ieven, M. 2008. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens. Journal of clinical microbiology, 46: 185-191.

Loens. K. Goossens H. and Ieven M. 2010. Acute respiratory infection due to Mycoplasma pneumoniae: current status of diagnostic methods, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 29: 1055-1069.

Luby, J. 1991. Pneumonia caused by Mycoplasma pneumoniae infection. Clinics in chest medicine, 12: 237-244.

Macfarlane, J., Holmes, W., Gard, P., Macfarlane, R., Rose, D., Weston, V., Leinonen, M., Saikku, P. and Myint, S. 2001. Prospective study of the incidence, aetiology and outcome of adult lower respiratory tract illness in the community. Thorax, 56: 109-114.

Matas, L., Domínguez, J., De Ory, F., García, N., Galí, N., Cardona, P. J., Hernández, A., Rodrigo, C. and Ausina, V. 1998. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of Mycoplasma pneumoniae-specific IgM in paediatric patients. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 30: 289-293.

McCormack, GE. 1993. Susceptibility of mycoplasmas to antimicrobial agents: clinical implications. Clin. Infect. Dis., 17: 200-201.

Medjo, B., Atanaskovic-Markovic, M., Radic, S., Nikolic, D., Lukac, M. and Djukic, S. 2014. Mycoplasma pneumoniae as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis. Italian Journal of Pediatrics, 40: 1-7.

Miller, N., Hernandez, S. G. and Cleary, T. J. 1994. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and PCR for direct detection of

Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 32: 393-397.

Narita, M. Matsuzono, Y. Togashi, T. and Kaji, N. 1992. DNA diagnosis of central nervous system infection by Mycoplasma pneumoniae. Pediatrics J., 90: 250-3.

Nour, M, Trabelsi, A, Maatouk, N, Hammami, M. 2005. Amplification of P1 and 16S rRNA genes by nested PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae in paediatric patients. Pathol. Biol. Paris 53: 9-14.

Pasternack, R., Vuorinen, P. and Miettinen, A. 1997. Evaluation of the Gen-Probe Chlamydia trachomatis transcription-mediated amplification assay with urine specimens from women. Journal of Clinical Microbiology, 35: 676-678.

Perez, C. R. and Leigh, M. W. 1991. Mycoplasma pneumoniae as the causative agent for pneumonia in the immunocompromised host. Chest, 100: 860-861.

Principi, N., Esposito, S., Blasi, F., Allegra, L. and Mowgli Study Group. 2001. Role of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in children with community-acquired lower respiratory tract infections. Clinical Infectious Diseases, 32: 1281-1289.

Qu, J., Gu, L., Wu, J., Dong, J., Pu, Z., Gao, Y., Hu, M., Zhang, Y., Gao, F. and Cao, B. 2013. Accuracy of IgM antibody testing, FQ-PCR and culture in laboratory diagnosis of acute infection by Mycoplasma pneumoniae in adults and adolescents with community-acquired pneumonia. BMC Infectious Diseases, 13: 1-6.

Ratliff, A.E., Duffy, L.B. and Waites K.B. 2014. Comparison of the illumigene Mycoplasma DNA amplification assay and culture for detection of Mycoplasma pneumonia. J. Clin. Microbiol., 52: 1060-1063.

Räty, R. Rönkkö, E. and Kleemola, M. 2005. Sample type is crucial to the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia by PCR. J. Med. Microbiol., 54: 287-291.

Razin, S. 1997. Comparative genomics of mycoplasmas. Wien Klin Wochenschr, 109: 55-6.

Rutala, W. A. and Weber, D. J. 2004. Reprocessing endoscopes: United States perspective. Journal of Hospital Infection, 56: 27-39.

Saito, R., Misawa, Y., Moriya, K., Koike, K., Ubukata, K. and Okamura, N. 2005. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay

for rapid detection of Mycoplasma pneumoniae. Journal of medical microbiology, 54: 1037-1041.

Saraya, T., Kurai, D., Nakagaki, K., Sasaki, Y., Niwa, S., Tsukagoshi, H., Nunokawa, H., Ohkuma, K., Tsujimoto, N. and Hirao, S. 2014. Novel aspects on the pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia and therapeutic implications. Frontiers in Microbiology, 5: 4-10.

Sauteur, P. M. M., van Rossum, A. M. and Vink, C. 2014. Mycoplasma pneumoniae in children: carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance. Current opinion in infectious diseases, 27: 220-227.

Shbib, S and Soukkarieh, C. 2015. The Accuracy of API 20E and PCR using 16s rRNA gene for characterization of Escherichia coli strains causing urinary tract infections in Damascus-Syria. Int.J. Pharm.Tech. Res., 8: 741-749.

Sillis, M. 1993. Modern methods for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia. Rev. Med. Microbiol., 4: 24-31.

Silvia, B., Loreto, F., Albert, B., Cristina, P., Aida, R., Lurdes, M., Carlos, R. and Vicente, A. 2011. Comparison of 2 molecular assays and a serologic test in diagnosing Mycoplasma pneumoniae infection in paediatrics patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 71: 463-466.

Skakni, L., Sardet, A., Just, J., Landman-Parker, J., Costil, J., Moniot-Ville, N., Bricout, F. and Garbarg-Chenon, A. 1992. Detection of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30: 2638-2643.

Talkington, D. F., Shott, S., Fallon, M. T., Schwartz, S. B. and Thacker, W. L. 2004. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to Mycoplasma pneumoniae in human serum. Clinical and Vaccine Immunology, 11: 862-867.

Tarp, B., Jensen, J. S., Ostergaard, L. and Andersen, P. L. 1999. Search for agents causing atypical pneumonia in HIV-positive patients by inhibitor-controlled PCR assays. European Respiratory Journal, 13: 175-179.

Taylor-Robinson, D. and Bébéar, C. 1997. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 40: 622-630.

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Graffelman, A. W., Van Schie, J. M., Crielaard, J. W., Sillekens, P., Van Den Broek, P. J., Goossens, H., Beersma, M. F. C. and Claas, E. C. J. 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae. Journal of Clinical Microbiology, 41: 4366-4371.

Thurman, K. A., Walter, N. D., Schwartz, S. B., Mitchell, S. L., Dillon, M. T., Baughman, A. L., Deutscher, M., Fulton, J. P., Tongren, J. E. and Hicks, L. A. 2009. Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of Mycoplasma pneumoniae in community outbreaks. Clinical Infectious Diseases, 48: 1244-1249.

Tjhie, J. H. T., van Kuppeveld, F. J. M., Roosendaal, R., Melchers, W. J. G., Gordijn, R., MacLaren, D. M., Walboomers, J. M. M., Meijer, C. J. L. M. and van der Brule, A. J. C. 1994. Direct PCR enables detection of Mycoplasma pneumoniae in patients with respiratory tract infections. J. Clin. Microbiol. 32: 11-16.

Uldum, S. A., Jensen, J. S., Søndergård-Andersen, J. and Lind, K. 1992. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to Mycoplasma pneumoniae. Journal of clinical microbiology, 30: 1198-1204.

Ursi, D., Ieven, M., Noordhoek, G. T., Ritzler, M., Zandleven, H. and Altwegg, M. 2003. An interlaboratory comparison for the detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples by the polymerase chain reaction. Journal of microbiological methods, 53: 289-294.

Van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., Hjelm, E., Van der Logt, J. T. and Melchers, W. J. 1994b. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13: 401-405.

van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., Hjelm, E., van der Logt, J. T. and Melchers, W. J. 1994. 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. European journal of clinical microbiology &

infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 13: 401-405.

Van Kuppeveld, F. J., Van der Logt, J. T., Angulo, A. F., Van Zoest, M. J., Quint, W. G., Niesters, H. G., Galama, J. M. and Melchers, W. J. 1992a. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2606-2615.

Vu, A. C., Foy, H. M., Cartwright, F. D. and Kenny, G. E. 1987. The principal protein antigens of isolates of Mycoplasma pneumoniae as measured by levels of immunoglobulin G in human serum are stable in strains collected over a 10-year period. Infection and immunity, 55: 1830-1836.

Waites, K. B. and Talkington, D. F. 2004a. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. Clinical microbiology reviews, 17: 697-728.

Waites, K. B., Balish, M. F. and Atkinson, T. P. 2008b. New insights into the pathogenesis and detection of Mycoplasma pneumoniae infections, 17: 635-648

Waites, K. B., Xiao, L., Paralanov, V., Viscardi, R. M. and Glass, J. I. 2012c. Molecular methods for the detection of Mycoplasma and ureaplasma infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. The Journal of Molecular Diagnostics, 14: 437-450.

Waring, A. L., Halse, T. A., Csiza, C. K., Carlyn, C. J., Musser, K. A. and Limberger, R. J. 2001. Development of a genomics-based PCR assay for detection of Mycoplasma pneumoniae in a large outbreak in New York State. Journal of clinical microbiology, 39(4): 1385-1390.

Watkins-Riedel, T., Stanek, G. and Daxboeck, F. 2001. Comparison of SeroMP IgA with four other commercial assays for serodiagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia. Diagnostic microbiology and infectious disease, 40: 21-25.

Williamson, D. L., Drake, J. B., Hack, J. J., Jakob, R. and Swarztrauber, P. N. 1992. A standard test set for numerical approximations to the shallow water equations in spherical geometry. Journal of Computational Physics, 102: 211-224.

Winchell, J. M., Thurman, K. A., Mitchell, S. L., Thacker, W. L. and Fields, B. S. 2008. Evaluation of three real-time PCR assays for detection of Mycoplasma pneumoniae in an outbreak investigation. Journal of clinical microbiology, 46: 3116-3118.

Wu, G., Wu, G., Wu, S. and Wu, H. 2017. Comparison of procalcitonin guidance-administered antibiotics with standard guidelines on antibiotic therapy in children with lower respiratory tract infections: a retrospective study in China. Medical Principles and Practice, 26: 316-320.

Xu, D., Li, S., Chen, Z. and Du, L. 2012. Reply to How to diagnose Mycoplasma pneumoniae etiology in a child with pneumonia. European journal of pediatrics, 171: 595-6.

Zhou, Z., Li, X., Chen, X., Yao, L., Pan, C., Huang, H., Luo, F., Zheng, X., Sun, X. and Tan, F. 2015. Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of Mycoplasma pneumoniae by nested PCR in adults in Zhejiang, China. The Journal of Infection in Developing Countries, 9: 244-253.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Nahd Shareef Madhloom MADHLOOM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Dhi-Qar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008-2012