

# Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Alevlenmelerinde Balgamda *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'in Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği ile Kantitatif Olarak Saptanması

## *Quantitative detection of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis on sputum in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease by real-time PCR*

Bengi Akın<sup>1</sup>, Baykal Tülek<sup>2</sup>, Uğur Arslan<sup>3</sup>, Latife Sütçü<sup>4</sup>, Duygu Fındık<sup>3</sup>, Mecit Süerdem<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, Konya

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, Konya

<sup>3</sup> Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Konya

<sup>4</sup> Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Konya

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) alevlenmesinin en sık rastlanılan üç bakteriyel etkeni olan *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'in gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile saptanması ve sonuçların kültür ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya KOAH alevlenmesi olan 62 hasta alındı. Hastalar Anthonisen kriterlerine göre sınıflandırıldı. Hastaların başvuru sırasında indüklenmiş balgam örnekleri alınarak üç solunum mikroorganizması için gerçek zamanlı PCR uygulandı.

**Bulgular:** Gerçek zamanlı PCR 47 hastada (%75.8) çalışılan üç mikroorganizmadan biri için pozitif, bakteri kültürleri ise sadece 11 hastada (%17.7) pozitif. Gerçek zamanlı PCR ile multipl patojenler de saptanabilirken kültür buna olanak sağlamadı. Çalışılan üç mikroorganizmanın gerçek zamanlı PCR ile saptanma oranları sırasıyla *S. pneumoniae* %53.2, *H. influenzae* %17.7 ve *M. catarrhalis* %35.5 şeklindeydi. Gerçek zamanlı PCR sonuçları ile hasta karakteristikleri arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

**Sonuç:** Çalışmamızda, KOAH alevlenmesiyle başvuran hastalarda gerçek zamanlı PCR tekniği ile bakteri saptanma oranları kültüre göre belirgin derecede yüksekti. İnfekte alevlenme oranının yüksek olması nedeniyle, orta ve ağır şiddette alevlenmeli has-

### ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study was the detection of the most common three bacterial causes (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* and *M. catarrhalis*) of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbations, using real-time polymerase chain reaction (PCR) technique and to compare it with the culture results.

**Methods:** Sixty two patients with COPD exacerbation were enrolled to the study. Patients were classified according to Anthonisen's criteria for COPD exacerbations. Real-time PCR for 3 respiratory microorganisms was performed on induced sputums collected at admission.

**Results:** Real-time PCR was positive in 47 patients (75.8%) for at least one of the three microorganisms, however bacterial cultures were positive in only 11 patients (17.7%). Multiple pathogens were also found with real-time PCR but were not detected by culture. Detection rates of the three studied microorganisms by real-time PCR were as follows: *S. pneumoniae* 53.2%, *H. influenzae* 17.7% and *M. catarrhalis* 35.5%. There was no significant relationship between real-time PCR results and patient characteristics.

**Conclusion:** Our study showed that the prevalence of bacteria detected by real-time PCR was substantially higher in comparison

Alındığı tarih: 21 Şubat 2011; Revizyon sonrası alınma: 04 Nisan 2011; Kabul tarihi: 05 Nisan 2011

Yazışma adresi (Address for correspondence): Yard. Doç. Dr. Baykal Tülek, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı 42075 Konya, Tel: 0 (332) 241 50 00; E-posta: baykaltulek@yahoo.com

© 2011 Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD)

Solunum 2011;13(1): 32-40

Solunum Dergisi'ne www.solunum.org.tr adresinden ulaşabilirsiniz.

talara ampirik antibiyotik tedavisi başlanmalı ve verilecek antibiyotikler üç ana solunum patojenini etkileyebilecek spektruma sahip olmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*

to the culture. Because of the high rate of infected exacerbations, an ampicillin antibiotic therapy should be started and the spectrum of this therapy should cover these three major respiratory pathogens.

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease, real-time PCR, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) alevlenmeleri hastalık progresyonunu hızlandırır ve yaşam kalitesini önemli oranda azaltır. Alevlenme dönemlerinde KOAH'a bağlı mortalite riski artar ve hastalar genellikle alevlenme dönemlerinde kaybedilir.<sup>1,2</sup> Solunum yolu infeksiyonları, alevlenmelerin %80-90'ının nedeni olarak gösterilmektedir. İnfeksiyonların en az yarısından bakteriler, yaklaşık olarak üçte birinden ise virüsler sorumludur. Çok az oranda da atipik bakterilerin rolü vardır. KOAH'ta infekte alevlenmelere neden olan bakteriler, tüm solunum sistemi infeksiyonlarında en sık izole edilen patojenler oldukları için solunum bakterileri olarak da adlandırılan *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'dir.<sup>3</sup> Bakteriyel etiyojijiyi belirlemede balgam kültürlerinin sensitivite ve spesifitesi düşüktür. Virüs kültürleri ise rutinde uygulanmamaktadır. Dolayısıyla klinisyenler, alevlenmelerin infeksiyona bağlı olup olmadığını bilmeden ve eğer alevlenme nedeni infeksiyon ise neden olan patojen veya patojenleri belirleyemeden ampirik antibiyotik tedavisi başlamak zorundadırlar.

Ampirik antibiyotik kullanımında, söz konusu toplumda alevlenmelere neden olan patojenlerin cins ve sorumluluk dereceleri ile direnç özelliklerinin belirlenmesi, ucuz ve etkili antibiyotik seçimi için önemli olmaktadır.<sup>1,2</sup> Klinik çalışmalarda, infeksiyon etkeninin saptanmasında genellikle balgam kültürleri kullanılır ve bu yöntem, altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ancak balgam kültürü yönteminin sensitivite ve spesifitesi düşük olduğu için, son zamanlarda moleküler tanı yöntemleri çalışılmış ve DNA-temelli yöntemlerin kültüre göre çok daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Bu yöntemlerin bir avantajı da tek mikrobiyolojik örnekten birden fazla patojenin saptanabilmesidir. Son yıllarda geliştirilen ve genetik mühendisliğinin ilerlemesiyle ortaya çıkan moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), çok düşük miktarlardaki DNA ya da RNA'yı sınırsız sayıda çoğaltmaya yarayan hızlı ve duyarlı bir *in vitro* tanı yöntemidir.<sup>4</sup>

Bu çalışmada, KOAH infekte alevlenmesi nedeniyle hastaneye başvuran hastalarımızın indükte balgamlarında sık karşılaşılan solunum yolu patojenleri olan *S. pneumoniae*,

*H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'in gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi ve elde edilen bulguların önümüzdeki yıllarda ampirik antibiyotik tedavisine rehber oluşturması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hasta grubu

Eylül 2009 - Nisan 2010 tarihleri arasında KOAH alevlenmesi ile Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi ve Selçuklu Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları kliniklerine başvuran, ayaktan veya yatırılarak tetkik edilen hastalar çalışmaya alındı. KOAH ve alevlenme tanıları GOLD'da tanımlanan kriterlere göre konuldu. Anthonisen'in tarif ettiği kriterlere göre alevlenme ağırlık derecesi belirlendi.<sup>5</sup> Son iki hafta içinde antibiyotik kullanımı, son iki ay içinde pnömoni hikayesi, belirgin bronşektazi varlığı, konjestif kalp yetersizliği veya diğer nedenlere (metabolik asidoz, ciddi anemi, nöromusküler hastalıklar gibi) bağlı olarak gelişmiş olabilecek dispne varlığı, mekanik ventilasyon gerektiren solunum yetmezliği, malignensi veya ağır immünyüpresyon bulunan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Araştırma için Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alındı (30.01.2009/043). Tüm hastalar çalışma konusunda bilgilendirildi ve yazılı onamı alındı. Hastalara hazırlanmış olan formlardaki sorular yöneltildi. Bu formlarda hastaların cinsiyeti, yaşı, KOAH süresi, balgam miktarı ve karakteri, sigara kullanımı, biyomas öyküsü, komorbidite varlığı, ilaç kullanımı, son bir yıldaki alevlenme, acile başvuru, hospitalizasyon sayıları ve NIMV gereksinimi sorgulandı.

### Laboratuvar testleri

Hastalar akciğer grafisi, solunum fonksiyon testi (SFT), arteriyel kan gazları (AKG), elektrokardiyografi, hemogram, biyokimya ve mikrobiyoloji sonuçları ile değerlendirildi. SFT için SensorMedics MVmax22 (California, ABD) spirometri cihazı kullanıldı. Dik oturur durumda iken en az 3 spirometri örneği alınarak en iyisi değerlendirmeye alındı. 400 µg salbutamol inhalasyonu ile reversibilite testi yapılarak postbronkodilatör FEV<sub>1</sub> değerleri kaydedildi. AKG, oksijensiz olarak heparinli enjektöre alınarak Bayer 555

Date Behring cihazı (Bayer HealthCare East Walpole, MA 02032-1597 ABD) ile ölçüldü.

### Örneklerin bakteriyolojik incelemesi

Hastalara, ağız ve larinks bol suyla çalkalattırıldıktan sonra ultrasonik nebülizer kullanılarak %3'lük sodyum klorür solüsyonu (hipertonik) ile balgam indüksiyonu yapıldı.<sup>6,7</sup> Balgam örnekleri, her hastadan üçer adet olmak üzere, distile su içeren 15 ml'lik falkon tüplerine alındı. Balgam örneklerinden yapılan Gram boyalı preparatlar mikroskopta incelendiğinde, 100'lük büyütmede her alanda 10'un altında epitel hücresi ve 25'in üzerinde lökosit içeren örnekler, uygun balgam örneği olarak kabul edildi.<sup>8</sup> Uygun olan balgam örnekleri aynı gün EMB (Eosin Metilen Blue) agar ve kanlı agar besiyerlerine ekilerek 37°C'ta 18 - 36 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sonuçlar değerlendirildi. PCR çalışması için ayrılan balgam örnekleri test gününe kadar -80°C'ta saklandı.

### Gerçek zamanlı PCR tekniği ile bakteriyel DNA kantitasyonu

Balgamdan bakteri DNA'sının izolasyonu için *High Pure PCR Template Preparation Kit*'i (Cat.No. 11 796 828 001, Roche Diagnostic, Almanya) kullanıldı. *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'in DNA kantitasyonu için kullanılan yöntemler ve konsantrasyonlar optimize edildi. Kantitasyon için bakterilere uygun primerlerin (forward ve revers) ve probların dizaynı yapıldı ve temin edildi (Tıbbi Molbiol, Almanya). Gerçek zamanlı PCR saptaması için önce miksler hazırlandı. Her bir örnek için PCR tüplerine 5 µl örneklerden izole edilen template (örnek DNA'sı) ve üzerine sırayla Roche firması *TaqMan master miks*'inden 4 µl (içeriğinde; fast start Taq DNA polimerase, reaksiyon buffer, MgCl<sub>2</sub> dNTP miks), 4 µM forward primer (1 µl) ve revers primer (1µl), 5 µM prob (1 µl) ve üzerine 8 µl toplam volüm 20 µl olacak şekilde PCR grade distile su eklenip ayarlandı. Gerçek zamanlı PCR çalışmasında kullanılmak üzere standartlar 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>4</sup> ve 1x10<sup>2</sup> kopya/ml olarak belirlendi ve firmadan (Roche diagnostic) temin edildi. Hazırlanan miks'ten tüm standartlara 20 µl dağıtıldı. Ayrıca bir adet de negatif kontrol (reagent miks'ten 20 ml + 5 ml steril distile su) kullanıldı. Hazırlanan PCR karışımında bakteriyel yük tayini için gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler®, Roche diagnostic, Almanya) kullanıldı. LightCycler® prosedürüne göre gerçek zamanlı PCR tekniği kullanılarak kantitasyon bu cihazda yapıldı. Çalışmada, cihaz basamak 1'de (*hold*) 95°C'ta 10 dakikalık tek bir siklustan sonra basamak 2'de (*cycle*) 95°C'ta 15 saniye ve 60°C'ta 1 dakika olmak üzere 40 siklus yapıldı. Sikluslar sonunda siklus sayısı ile birlikte artan floresan ışığa göre çizilen logaritmik eğriye (*threshold*) göre hastalara ait örneklerin DNA düzeyleri bu eğri üzerine yerleştirilerek sonuçlar değerlendirildi.

### İstatistiksel analiz

SSPS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences) programıyla istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Parametrik varsayımlar sağlanmadığı için iki grup karşılaştırılırken "*Mann-Whitney U*" testi kullanıldı, ikiden fazla grup ortalamasını test etmek için ise "*Kruskal-Wallis*" testi uygulandı. Parametrik değişkenlerde *Pearson* ve non-parametrik değişkenlerde *Spearman* korelasyon testleri ile ilişkiler değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### Hastalar

Çalışmaya alınan 62 hastanın hepsi erkekti. Hasta grubunun yaş aralığı 32 ile 83 arasında değişiyordu. Hasta karakteristikleri **Tablo I**'de verildi. Hasta grubunun %11.3'ünü (7 hasta) evre 1, %29'unu (18 hasta) evre 2, %29'unu (18 hasta) evre 3 ve %14.5'ini (9 hasta) ise evre 4 hastalar oluşturuyordu. Hastaların %69.4'ü (43 hasta) ağır dereceli (Tip-1), %22.6'sı (14 hasta) orta dereceli (Tip-2), %8.1'i (5 hasta) ise hafif dereceli (Tip-3) alevlenme ile başvurmuştu.

Tüm hastaların anamnezinde nefes darlığında artma vardı. Kırk beş hastanın (%72.6) başvuru sırasında balgam volümünde artış, 8 hastanın (%12.9) balgam volümünde azalma vardı, 9 hastanın (%14.5) ise balgam volümünde değişiklik yoktu. Bir hastanın balgam karakteri seröz, 11'inin mukoid, 28'inin mukopürülan, 20'sinin pürülan, 1'inin pürülan ve hemopteik, 1'inin ise mukopürülan ve hemopteik idi. Hastaların 54'ünde (%87.1) balgam pürülanında artış saptandı.

### Laboratuvar bulguları

Hastaların 52'sinde, tekniğine uygun SFT yapılabildi. Hastaların laboratuvar bulguları **Tablo I**'de verilmektedir.

### Balgam örneklerinin kültür sonuçları

Gram boyalı preparatlarda 47 hastada (%75.8) tek veya multipl tipte bakteri görüldü. Balgam örneklerinin 39'unda (%62.9) Gram-pozitif kok, 10'unda (%16.1) Gram-negatif kok, 8'inde (%12.9) Gram-pozitif diplokok, 11'inde (%17.7) Gram-pozitif basil, 4'ünde (%6.5) Gram-negatif basil izlendi. Balgam kültürlerinde, 11 hastada (%17.7) bir patojen mikroorganizma üremesi belirlenirken, 51 hastada (%82.3) normal boğaz florası (NBF) görüldü. Balgam kültürü sonuçları **Tablo II**'de gösterilmektedir.

Hastaların KOAH evrelerine bakıldığında, evrelendirme yapılanlar içinde evre 1 hastaların 1'inde *M. catarrhalis*, 1'inde *Enterobacter* üremesi, 5'inde de normal flora izlendi. Evre 2 hastaların 1'inde *Enterobacter*, 17'sinde normal flora üremesi saptandı. Evre 3 hastaların birinde *Acinetobacter baumannii*, ikisinde *M. catarrhalis*, 15'inde ise normal flora

**Tablo I.** Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları

Hasta sayısı(N)	62
Erkek/Kadın	62/0
Yaş	65.3 ± 9.7
KOAH süresi (yıl)	12.3 ± 8.9
Sigara Kullanımı	
Halen sigara kullanan	46 (%74.2)
Sigarayı bırakan	16 (%25.8)
Sigara miktarı (paket-yıl)	49.1 ± 26.2
Sigara bırakma süresi (yıl)	7.8 ± 10.4
Biyomas öyküsü	24 (%38.7)
Komorbidite varlığı	40 (%64.5)
Alevlenme sayısı (son 1 yılda)	3 (0-20)
Acile başvuru sayısı (son 1 yılda)	1 (0-15)
Hastaneye yatış sayısı (son 1 yılda)	1 (0-7)
NIMV gereksinimi (son 1 yılda)	0 (0-3)
Solunum Fonksiyon Testi+	
FVC (%)	69.3 ± 21.6
FEV <sub>1</sub> (%)	50.8 ± 23.1
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	54.8 ± 11.7
PEF (%)	46.4 ± 16.5
Arter Kan Gazı	
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	39.6 ± 6.9
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	55.8 ± 9.8
SaO <sub>2</sub> (%)	88.1 ± 6.0
WBC /mm <sup>3</sup>	11.4 ± 4.4
Sedimentasyon (mm/h)	25.6 ± 18.5
CRP (mg/L)	36.6 ± 48.1

Değerler hasta sayısı (%), ortalama ± standart sapma ve ortanca (min-max) olarak belirtilmiştir. NIMV: noninvaziv mekanik ventilasyon + Solunum fonksiyon testi değerleri 52 hastadan alınmıştır.

görüldü. Evre 4'te 1 hastada *Pseudomonas*, 1 hastada *M. catarrhalis*, 7 hastada ise normal flora izlendi. Ağır dereceli alevlenme ile başvuran hastaların 4'ünde *M. catarrhalis*,

**Tablo II.** Balgam kültürü sonuçları

Mikroorganizma	Hasta sayısı
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6
<i>Enterobacter</i>	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	1
Normal flora	51
Toplam	62

1'inde *Enterobacter*, 1'inde *Acinetobacter baumannii*, 1'inde *Serratia marcescens*, 1'inde *Pseudomonas* üremesi görülürken 35'inde normal flora izlendi. Orta dereceli alevlenme ile başvuran hastaların 2'sinde *M. catarrhalis*, 1'inde *Enterobacter*, 11'inde normal flora tespit edildi. Hafif dereceli alevlenme ile başvuran hastaların hepsinde normal flora izlendi.

### Balgam örneklerinin gerçek zamanlı PCR sonuçları

Gerçek zamanlı PCR tekniğinde, sikluslar sonunda siklus sayısı ile birlikte artan floresan ışığa göre logaritmik eğri çizildi. Hastalara ait örneklerin DNA düzeyleri standartların oluşturduğu logaritmik çoğalma eğrilerinden geçen eşik çizgisi esas alınarak hesaplandı. Pozitif örneklerin oluşturduğu logaritmik eğrilerin oluşturulan bu eşik çizgisini kestiği noktalar, o örnek için konsantrasyonu belirledi. *S. pneumoniae* için minimum olarak 10 kopya/mL, *H. influenzae* için 5 kopya/mL, *M. catarrhalis* için ise 4 kopya/mL düzeyindeki bakteri yükü, kantitatif olarak saptandı. Gerçek zamanlı PCR ile toplam 62 hastanın 47'sinde (%75.8) araştırılan üç patojen bakteriden en az biri bulundu. Otuz balgam örneğinde tek bir bakteri saptanırken, 17 balgam örneğinde birden fazla bakteri saptandı. Tek bakteri saptanan 30 hastanın 17'sinde *S. pneumoniae*, 9'unda *M. catarrhalis*, 4'ünde *H. influenzae* görüldü. Balgam gerçek zamanlı PCR sonuçları **Tablo III**'te gösterilmektedir.

Gerçek zamanlı PCR ile balgam örneklerinde mikroorganizma saptanma oranı (%75.8), balgam kültürüne (%17.7) göre belirgin olarak daha fazlaydı. Balgam kültürüyle *M. catarrhalis* saptanan 6 hastanın balgam örneklerinin gerçek zamanlı PCR sonuçları değerlendirildiğinde, 3 örnekte sadece *M. catarrhalis*, 3 örnekte ise *S. pneumoniae* + *M. catarrhalis* (2'li miks) olmak üzere tüm hastalarda *M. catarrhalis* tespit edildiği görüldü.

**Tablo III.** Balgam PCR sonuçları

PCR sonuç	Hasta sayısı	Yüzde (%)
<i>S. pneumoniae</i> *	33	53.2
<i>H. influenzae</i> *	11	17.7
<i>M. catarrhalis</i> *	22	35.5
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> (2'li miks)	4	6.5
<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. catarrhalis</i> (2'li miks)	10	16.1
<i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i> (2'li miks)	1	1.6
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. catarrhalis</i> (3'lü miks)	2	3.2
Bakteri saptanmayan	15	24.2

\* Hasta sayısı ve yüzde (%) değerler *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* saptanan miks örnekleri de içermektedir.

Gerçek zamanlı PCR’de bakteri saptanan ve saptanmayan hastalar yaş, hastalık süresi, son bir yıldaki alevlenme, acile başvuru, hospitalizasyon, NIMV gereksinimi, sigara ve balgam miktarları, AKG, SFT, lökosit, sedimentasyon ve CRP değerleri açısından karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

Evrendirme yapılabilen hastalar dikkate alındığında, gerçek zamanlı PCR’de bakteri saptanan hastaların %38.3’ünü (18 hasta) evre 3 hastalar oluşturuyordu. KOAH evrelerine göre gerçek zamanlı PCR sonuçları **Tablo IV**’te, KOAH alevlenme derecesine göre gerçek zamanlı PCR sonuçları ise **Tablo V**’te gösterilmektedir.

Gerçek zamanlı PCR’de bakteri saptanmayan, tek bakteri saptanan ve multipl bakteri saptanan hasta grupları, klinik karakteristikleri ve laboratuvar bulguları açısından karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

## TARTIŞMA

İnfeksiyona neden olan bakterilerin belirlenmesi ve kantitatif sayımları solunum sistemi infeksiyonları tanısında önemlidir. Günümüzde rutin, klinik mikrobiyoloji kültür tekniklerine dayanmaktadır. Ancak solunum sistemi infeksiyonları tanısında balgam kültürü, sonuçların geç alınmasının yanı sıra sensitivitesinin düşük olması nedeniyle genellikle tanıda yol gösterici olmamaktadır. Balgam kültürünü dikkate alarak tedaviyi planlamak önemli oranda tedavi başarısızlığına yol açabilmektedir. Diğer yandan, solunum sistemi infeksiyonlu hastaların çoğunda balgam çıkarma olmaz ve önemli bir bölümü de doktora gittiğinde zaten bir şekilde antibiyotik kullanımına başlamış bulunmaktadır. Sık görülen ve önemli morbidite ile mortalite nedeni olan toplum kökenli pnömoniler ele alındığında, olguların sadece %50’sinde balgam kültürü ile etiyolojik tanı konabilmektedir.<sup>9</sup> Bu nedenle, solunum sistemi infeksiyonları kılavuzları ampirik antibiyotik tedavisinin kuralları üzerine kurulmuştur.

Moleküler teknikler infeksiyonların laboratuvar tanısında hassas ve hızlı teknikler olarak kabul edilmektedir. Mikrobiyolojik örnekte bulunan mikroorganizma DNA’sının saptanmasına dayalı PCR yöntemi, solunum sistemi infeksiyonlarında son yıllarda araştırmaların konusu olmaya başlamıştır.<sup>10</sup> PCR tekniği, en azından seçilmiş olgularda, balgamın tanıda yetersiz kalması sorununu önemli oranda çözecek gibi görünmektedir. Diğer yandan, infeksiyonlar multipl patojenlere bağlı olabilmekte ve bu nedenle ciddi infeksiyonlarda kısa sürede aynı anda bu patojenlerin tespit edilmesine gerek duyulabilmektedir. Böyle bir durumda da yine PCR ile tek mikrobiyolojik örnekten aynı anda birden fazla sayıda patojen belirlenebilir. Ancak, tekniğin pahalı olması ve her laboratuvarında uygulanacak kadar basit olmaması, yöntemin günümüzde genellikle solunum sistemi infeksiyonlarında araştırma amaçlı ve sadece seçilmiş olgularda tanı amaçlı uygulanmasına neden olmaktadır.<sup>4</sup>

Biz çalışmamızda, KOAH alevlenmeleri ile kliniğimize başvuran hastalarımızın indüklenmiş balgam örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemini kullanarak en sık alevlenme nedeni olan üç bakteriyi (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*) saptamayı amaçladık. Çalışmada alevlenme döneminde bulunan 62 KOAH hastasının 11’inde (%17.7) balgam kültüründe patojen bakteri üremesi oldu ve bunların 6’sı (%9.7) *M. catarrhalis* idi. Diğerlerinin hepsi Gram-negatif enterik bakterilerdi (2 kültürde *Enterobacter* ve birer kültürde *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*). Aynı balgam örneklerinin gerçek zamanlı PCR tekniğiyle incelenmesinde ise, 62 hastanın 47’sinde (%75.8) patojen bakteri (33 *S. pneumoniae*, 22 *M. catarrhalis*, 11 *H. influenzae*) saptadık. Otuz örnekte sadece tek, diğer 15 örnekte iki, 2 örnekte ise üç bakteri birden vardı.

Kais ve arkadaşları (11), alt solunum yollarında *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*’in saptanması üzerine yaptıkları çalışmada, 203 hastanın (89 toplumdan kökenli pnömoni, 27 hastane kökenli pnömoni, 19 bronşit veya

**Tablo IV.** KOAH evrelerine göre PCR sonuçları

		Evre			
		1 (N=7)	2 (N=18)	3 (N=18)	4 (N=9)
		<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
PCR sonucu	<i>S. pneumoniae</i> *	3	8	14	6
	<i>H. influenzae</i> *	1	3	6	0
	<i>M. catarrhalis</i> *	4	4	6	4
	Miks	3	3	6	3
	Bakteri saptanmayan	1	6	0	2

\* n değerleri *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* saptanan miks örnekleri de içermektedir.

**Tablo V.** KOAH alevlenme derecesine göre PCR sonuçları

		KOAH alevlenme derecesi		
		Ağır (Tip-1) (N=43)	Orta (Tip-2) (N=14)	Hafif (Tip-3) (N=5)
		<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
PCR sonucu	<i>S. pneumoniae</i> *	25	6	2
	<i>H. influenzae</i> *	9	1	1
	<i>M. catarrhalis</i> *	15	6	1
	Miks	13	3	1
	Bakteri saptanmayan	8	4	3

\* n değerleri *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* saptanan miks örnekleri de içermektedir.

KOAH alevlenmesi, 54 non-infeksiyöz pulmoner hastalık, 14 hasta eksik veriye sahip) solunum yolu örneklerinde (106 balgam, 51 PBS ve 46 BAL) kantitatif kültür ile 45'inde (%22.2) gerçek zamanlı kantitatif PCR ile 68'inde (%33.5) anlamlı patojen saptamışlardır. PCR, tetkiklerin pozitifliğini anlamlı olarak artırmıştır. PCR'de en fazla anlamlı artış *H. influenzae*'da görülmüştür. Kültür ve PCR kombine edildiğinde, alt solunum yolu semptomu olan hastalarda %44, semptom olmayanlarda %16 oranında *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* belirlenmiştir.

Roche ve arkadaşları,<sup>12</sup> KOAH alevlenmesi ile gelen 118 hastanın 200 alevlenmesinde patojenleri tespit etmek için kantitatif balgam kültürü yapmışlardır. Yüz sekiz hastanın balgamında üreme olmuştur. En çok *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* tespit edilmiştir. Sigara içme öyküsü ile pozitif kültür arasında ilişki bulunamamış, ancak pozitif kültürü hastaların FEV<sub>1</sub> değerleri daha düşük bulunmuştur. Hastaneye yatış sayısı fazla olanlarda pozitif kültür oranı daha fazla olmuş ve farkın *H. influenzae*'dan kaynaklandığı görülmüştür. Ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da sigara içme öyküsü ile gerçek zamanlı PCR pozitifliği arasında ilişki bulunmadı.

Larsen ve arkadaşları<sup>13</sup>, 118 KOAH hastasının solunum yolu örneklerinde (balgam, trakeal aspirat, BAL) %50 kültür pozitifliği saptamıştır. Çoğu *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* olup 6 hastada miks üreme bulunmuştur. Kültür pozitif ve kültür negatif gruplar arasında yaş, sigara kullanımı, FEV<sub>1</sub> ve CRP değerleri açısından fark bulunmamıştır. FEV<sub>1</sub> düşük olan hastalarda *P. aereginosa* sıklığı fazla olmuştur. Bizim çalışmamızda ise, kültür pozitif hastaların %54.5'inde *M. catarrhalis* saptandı, gerçek zamanlı PCR tekniğinde ilk iki sırayı *S. pneumoniae* ve *M. catarrhalis* (sırasıyla; %53.2 ve %35.5) aldı. Çalışmamızda yaş, sigara kullanımı, FEV<sub>1</sub> ve CRP değerleri açısından PCR'de etken saptanan ve saptanmayan hastalar arasında fark bulunmadı. Bazı çalışmalarda<sup>14</sup> yüksek CRP, düşük FEV<sub>1</sub>, pürülan balgam ve bakteriyel infeksiyon arasında tutarlılık gösterilmiştir.

Balgam kültürlerinde başta *M. catarrhalis* olmak üzere Gram-negatif enterik bakterilerin üremesinin ve gerçek zamanlı PCR'de *M. catarrhalis*'in *S. pneumoniae*'den sonra ikinci sıklıkta izole edilmesinin nedeni, olguların önemli bir bölümünün tip I (%69.4) ve tip II (%22.6) KOAH alevlenmesi olmalarına bağlandı. Diğer yandan, *M. catarrhalis* üremesi ağırlıkla evre III ve IV olgularda gerçekleşti. Tüm bu veriler, literatür bulguları ile uyumludur.

Göçmen ve arkadaşları<sup>15</sup>, KOAH alevlenmesi nedeniyle takip edilen 103 hastanın retrospektif taraması sonucunda balgam kültürü pozitif olan 37 hastada (4 kadın, 33 erkek) üreyen mikroorganizmaları belirlemişlerdir. Onu (%27.0) *S. pneumoniae*, 7'si (%18.9) *P. aereginosa*, 6'sı (%16.2) *H. influenzae*, 4'ü (%10.8) *K. pneumoniae*, 3'ü (%8.1) *Serratia*, 2'si (%5.4) *Stenotrophomonas*, 1'i (%2.8) *E. coli* olup, 4'ü (%10.8) miks üreme şeklinde bulunmuştur. Ünel ve

arkadaşları (16), KOAH alevlenmelerinde *M. catarrhalis* insidansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, 100 hastanın balgam kültürlerinden 12'sinde (%12) *M. catarrhalis* saptamışlardır. *H. influenzae* 14, *S. pneumoniae* 6, *Pseudomonas spp.* 4, *Klebsiella spp.* 2, *E. coli* 1 hastada saptanmıştır. Memikoğlu ve arkadaşları<sup>17</sup> da, KOAH alevlenmelerinde *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* ve *H. influenzae*'nın sıklığını araştırmışlardır. Balgam kültürlerinde 85 örneğin 35'inde üreme olmuştur. Seksen beş örneğin 14'ünde (%16.5) *S. pneumoniae*, 8'inde (%9.4) *M. catarrhalis*, 5'inde (%5.8) *H. influenzae*, 4'ünde (%4.7) *E. coli*, 2'sinde (%2.4) *K. pneumoniae*, 1'inde (%1.2) *P. aereginosa*, 1'inde (%1.2) *S. aureus* izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda balgam kültüründe üreyen patojen mikroorganizmaların 6'sı (%9.7) *M. catarrhalis*, 2'si *Enterobacter* (%3.2), 1'i *Acinetobacter* (%1.6), 1'i *Serratia* (%1.6), 1'i ise *Pseudomonas* (%1.6) idi. Literatürdeki diğer araştırmalarla karşılaştırdığımızda *M. catarrhalis* izolasyon oranları diğer çalışmalarla uyumluydu.

Bütün bu çalışmaların sonuçlarına bakıldığı zaman, temelde üç solunum patojeninin değişik oranlarda izole edildiğini görüyoruz. KOAH infekte alevlenmelerinde değişik coğrafyalarda farklı oranlarda patojenlerin izole edilmesi çok doğaldır. Bu nedenle bölgelerdeki referans merkezlerin, belirli zaman dilimlerini kapsayan dönemlerde o bölgeye ait solunum patojenlerini belirlemeleri ve antibiyotik direnç araştırmaları yapmaları gerekmektedir. Kantitatif balgam kültürü çalışması ve antibiyotik direnç testlerinin yapılmaması, çalışmamızın önemli eksiklerindedir.

KOAH alevlenmelerinde yapılan bakteri kültür çalışmalarının sonuçlarını yorumlamak her zaman kolay değildir. Kültür çalışmaları heterojen hasta gruplarına dayanmaktadır ve farklı teknikler kullanılmaktadır. Diğer yandan remisyon dönemlerinde hastaların orofarengeal sekresyonları, balgam ve bronşiyal sekresyonlarında da patojen bakteri kolonizasyonu vardır. Bu çalışmalar, alevlenmelerde bakterilerin rolü ile ilgili sorulara kesin yanıt sağlamamaktadır. Dahası, balgam kültürleri, kolonizasyon-infeksiyon arasında ayırım yapamaz. Diğer yandan patojen bakterinin bulunmaması alt solunum yolu infeksiyonu olmadığını da göstermez. Klasik bir çalışma olan Austrian ve Gold<sup>18</sup> çalışmasında, bakteriyemi ile kanıtlanan pnömokoksik pnömoni hastaların dörtte birinin balgamında *S. pneumoniae* izole edilmiştir. Çalışmamızda indüklenmiş balgamların alınmasına, Gram boyamada nitelikli olan balgamların tetkik edilmesine ve olguların önemli bir bölümünde klinik olarak infekte alevlenme olasılığı (tip I %69.4, tip II %22.6 olguda) bulunmasına rağmen, örneklerin sadece %17.7'sinin kültüründe patojen bakteri üremesi oldu.

Rosell ve arkadaşları tarafından yapılan 337 olguluk (70 sağlıklı, 181 stabil KOAH, 86 alevlenme döneminde) çalışmada, PSB örneklerinde bakteri kültürleri yapılmış ve stabil dönemde %29, alevlenmede ise %54 oranlarında

üreme görülmüştür.<sup>19</sup> Stabil dönemde en sık kolonize olan patojenler *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*, alevlenmelerde ise predominant bakteriler *H. influenzae* ve *P. aeruginosa* olarak belirlenmiştir. Bronşiyal kolonizasyon hafif KOAH'ta bulunmamıştır. Orta şiddette hastaların dörtte birinde, ağır hastaların ise yaklaşık yarısında pozitif kültür bulunmuştur. PSB ile örnekler alındığı için çok değerli olan bu bulgular, tartışmaya yol açmayacak şekilde alevlenme dönemlerinde aşırı bakteri üremesini göstermesi açısından çok önemlidir. Bizim çalışmamızda, ağır dereceli alevlenme ile başvuran hastaların 8'inde (%18.6) ve orta dereceli alevlenme ile başvuran hastaların 3'ünde (%21.4) balgam kültüründe bakteri üremesi vardı. Hafif dereceli alevlenme ile başvuran hastaların hepsinde normal flora belirlendi. Çalışmamızın gerçek zamanlı PCR bölümünde ise ağır dereceli alevlenmede 35 (%81.4), orta dereceli alevlenmede 10 (%71.4), hafif dereceli alevlenmede ise 2 (%40) hastada bakteri saptandı.

Solunum sistemi infeksiyonlarının etiyolojik tanısında PCR çalışmalarının tarihi çok eski değildir ve son yıllarda bir artış görülmektedir. Bu tekniğe ilginin artmasının nedeni, tanı oranının çok yüksek olmasıdır. Greiner ve arkadaşları<sup>20</sup> gerçek zamanlı PCR ile 195 çocuğun nazofarengeal sekresyonlarında *S. pneumoniae*'nin kantitatif tespitini yapmışlar ve PCR'nin sensitivitesini %100, spesifitesini %96 bulmuşlardır. *M. catarrhalis* için spesifite %98, sensitivite %100 olarak bulunmuştur.<sup>21</sup> Solunum sistemi infeksiyonlarının tanısında PCR tekniğine karşı artan ilgiye karşılık KOAH alevlenmelerinde yeterli sayıda çalışma yapılmamıştır. Çalışmamız, KOAH alevlenmelerinde üç temel solunum bakterisinin PCR ile araştırıldığı az sayıdaki çalışmadan birisi olma özelliğine sahiptir.

Curran ve arkadaşları KOAH alevlenmelerinde balgamda bakterilerin belirlenmesi amacıyla ilk olarak gerçek zamanlı PCR yönteminin kullanıldığı çalışmayı yapmışlardır.<sup>4</sup> Otuz olgudan alınan balgam örneklerinin gerçek zamanlı PCR sonuçları, altın standart olarak kabul edilen balgam kültür sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Gerçek zamanlı PCR ile belirlenen bakteri prevalansı, dört solunum patojeni (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve *S. aureus*) için oldukça yüksek oranlarda bulunmuştur. Gerçek zamanlı PCR tekniğinin balgam kültürüne göre değerlendirilmesinde yüksek sensitivite, düşük spesifite değerleri elde edilmiştir. KOAH alevlenmelerinde gerçek zamanlı PCR ile kültürden daha çok sayıda bakteri saptanmasının yanı sıra aynı balgamda birden fazla patojen gösterilmiştir. Yine aynı gruba ait geçtiğimiz yıl yayınlanan bir diğer çalışmada,<sup>22</sup> KOAH'lı 14 hastanın balgam örneklerinde PCR ile önemli solunum sistemi patojenleri incelenmiştir. Örneklerin tümünden pozitif sonuç alınması üzerine, solunum sistemi infeksiyonu bulunan seçilmiş hastaların solunum sekresyonları kullanılarak PCR yöntemiyle etiyolojik tetkik yapılmasının yararlı bir yöntem olacağı ileri

sürülmüştür. Bu yöntemin özellikle kistik fibrozis ve bronşektazili hastalarda kullanılması tavsiye edilmiştir.

KOAH'ta alt solunum yollarında multipl patojen infeksiyonunun alevlenmelerdeki rolleri ve bu patojenlerin kendi aralarındaki interaksiyonları bilinmemektedir. Aynı anda birden fazla patojen ile infeksiyonun konak savunma sistemi ile ilişkisi de açık değildir.

Kantitatif balgam kültürleri ve modern yöntemlerin kullanımıyla alevlenmelerin yaklaşık %40-60'ının bakteriyel infeksiyonlardan kaynaklandığı görülmüştür.<sup>3,23</sup> Genellikle *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve daha az oranda *M. catarrhalis*, KOAH alevlenmeleri döneminde kültürlerde üreyen ve dolayısıyla infekte alevlenmelerden sorumlu tutulan patojen bakterilerdir. Diğer çalışmalarda<sup>24,25</sup> olduğu gibi, bizim çalışmamızda da KOAH alevlenmelerindeki infeksiyonların çoğundan bakterilerin (en sık *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* ve *H. influenzae*) sorumlu olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda gerçek zamanlı PCR tetkiki ile hastalarımızın %75.8'inde bu patojen bakterileri saptamamıza rağmen, indüklenmiş de olsa balgam kültürlerinde üreme oranımız literatür verilerinin oldukça altında bulunmuştur.

Hafif ve orta evredeki hastaların KOAH alevlenmelerinde sıklıkla bu üç bakterinin sorumlu olmasına karşılık, çok daha ağır evredeki hastaların balgamlarında üreyebilen patojenler *P. aeruginosa*, Gram-negatif enterobakteriler, *H. parainfluenzae* ve *S. aureus*'tur.<sup>3,26-28</sup> Alevlenmelerin %10-20'sinde birden fazla infeksiyöz ajanın sorumlu olduğu bilinmektedir.<sup>27</sup> Çalışmamızda gerçek zamanlı PCR'de 17 hastada (%27.4) mikts bakteri saptanmıştır, virüsler ve atipik bakteriler çalışılmamıştır.

Çalışmamızda balgam kültüründe en çok üreyen bakterinin *M. catarrhalis* olması ilginçtir. Ancak literatür taraması yaptığımızda, iyi bilinen iki çalışmada erişkin KOAH hastalarının balgamlarında *M. catarrhalis*'in diğer iki bakteriden daha sık izole edildiğini gördük.<sup>30,31</sup> *M. catarrhalis*, patojenik özellikleri az bilinen bir patojen olduğu için yıllarca göz ardı edilmiştir. Nokta prevalans çalışmalarında bu patojenin KOAH'lı hastaların hava yollarını herhangi bir zamanda kolonize ettiği bilinmektedir.<sup>31,32</sup> *M. catarrhalis* infeksiyonunun süresi, alevlenme nedeni olarak önemi, oluşturduğu immün yanıt ve bu yanıtın infeksiyon ve hastalıkla ilişkileri konusunda ise bilinenler azdır. İlginç bir gözlem, Murphy ve arkadaşlarının<sup>33</sup> çalışmalarında, antibiyotik tedavisi olmasa da hastaların ortalama 42 günden daha kısa sürede *M. catarrhalis* infeksiyonundan kurtulduklarını belirlemiş olmalarıdır.

Çalışmamızdaki balgam kültürlerinde *S. pneumoniae* üremedi. Pnömonokların erken evredeki KOAH'lılarda sık izole edilmesine karşılık, orta ve şiddetli KOAH'lı hastaların alevlenmelerinde bu patojen izolasyonunun düşük oranda olduğu rapor edilmiştir.<sup>23,34</sup> Eller ve arkadaşları<sup>35</sup> hastaneye yatırılarak tedavi edilen 211 KOAH alevlenme hastasını evrelere göre gruplandırarak, balgamlarında patojen

bakteri kültürleri yapmışlardır. Gruplandırma FEV<sub>1</sub> değerine göre yapılmıştır (grup I FEV<sub>1</sub> >%50, grup II %35-50, grup III <%35). Grup I'de *S. pneumoniae* ve diğer Gram-pozitif koklar, grup II'de *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*, grup III'te ise enterobakteriler ve psödomonas türleri izole edilmiştir. Patojen bakteri üremesi en sık grup III'te (%48.2) bulunmuştur. Bizim olgularımızın çoğunluğu orta ve şiddetli KOAH hastalarından oluştuğu için, balgam kültürlerinde *S. pneumoniae* ürememesini bu şekilde açıklayabiliriz. KOAH alevlenmelerinde son yıllarda pnömokok suşlarının düşük oranda belirlenmesinin önemli bir nedeni, pnömokok aşısının yaygın olarak kullanılması olabilir. Bazı alevlenmelerde ise balgamda bakteri tespit edilemez. Bunun değişik muhtemel nedenleri vardır. Alevlenmelerin üçte birinde solunum virüsleri alevlenme nedeni olmaktadır, alevlenmelerin %5-10'undan *M. pneumoniae* veya *C. pneumoniae*'nin sorumlu olduğu serolojik çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>3</sup>

Sonuç olarak gerçek zamanlı PCR tekniği, KOAH infeksiyöz alevlenmelerindeki etken mikroorganizmayı saptamada, kültür ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek pozitiflik oranlarına sahiptir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olgularımızın alevlenmeleri genellikle ağır şiddette olmaktadır ve en az üçte ikisinden patojen bakteriler sorumludur. *M. catarrhalis* prevalansı artış göstermektedir ve miks infeksiyon riski yüksektir. Kantitatif balgam kültürü çalışması ve antibiyotik direnç testlerinin yapılmaması, çalışmamızın yetersiz yanlarından biridir. Ancak alevlenme tedavisi için hastanemize başvuran hastalarımızda infekte alevlenme oranının yüksek olması nedeniyle tüm hastalara ampirik antibiyotik tedavisi başlanmalı ve verilecek antibiyotikler üç ana solunum patojenini etkileyebilecek spektruma sahip olmalıdır.

*Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no: 09102023).*

## KAYNAKLAR

- Macfarlane JT, Colville A, Guion A, Macfarlane RM, Rose DH. Prospective study of aetiology and outcome of adult lower-respiratory-tract infections in the community. *Lancet*. 1993 Feb 27;341(8844):511-4.
- Ball P, Harris JM, Lawson D, Tillotson G, Wilson R. Acute infective exacerbations of chronic bronchitis. *QJM*. 1995 Jan;88(1):61-8.
- Sethi S. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest*. 2000 May;117(5 Suppl 2):380S-5S.
- Curran T, Coyle PV, McManus TE, Kidney J, Coulter WA. Evaluation of real-time PCR for the detection and quantification of bacteria in chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Jun;50(1):112-8.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of COPD. *Ann Intern Med* 1987;106:196-204.
- Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl*. 2002 Sep;37:3s-8s.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
- Woods GL, Washington JA. The clinical and the microbiology laboratory. In: Mendell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). *Principles of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995:169-99.
- Reimer LG, Carroll KC. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis*. 1998 Mar;26(3):742-8.
- Bayram A, Kocoglu E, Balci I, Filiz A, Eksi F. Real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples from patients with community-acquired pneumonia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006 Dec;39(6):452-7.
- Kais M, Spindler C, Kalin M, Ortqvist A, Giske CG. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in lower respiratory tract samples by real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 Jul;55(3):169-78.
- Roche N, Kouassi B, Rabbat A, Mounedji A, Lorut C, Huchon G. Yield of sputum microbiological examination in patients hospitalized for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with purulent sputum. *Respiration*. 2007;74(1):19-25.
- Larsen MV, Janner JH, Nielsen SD, Friis-Moller A, Ringbaek T, Lange P. Bacteriology in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients admitted to hospital. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(1):26-32.
- Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. 2000 Jun;117(6):1638-45.
- Göçmen H, Yıldız A, Çoban H, Ursavaş A, Yeşilkaya S, Coşkun F ve ark. KOAH akut atakta infeksiyon etkenleri ve ampirik antibiyoterapiye direnç profili. *Solunum Hastalıkları* 2007;18:93-99.
- Ünel N, Oltan N, Ak Ö, Saraç G, Özer S. Kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut alevlenmelerinde *M. catarrhalis* insidansı. *Klinik* 2000;13(2):51-53.
- Memikoğlu KO, Azap A, Kurt Ö, Sözen TH, Tekeli ME. Kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut alevlenmesinde *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* sıklığı. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58:57-60.
- Austrian R, Gold J. Pneumococcal Bacteremia with Especial Reference to Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. *Ann Intern Med*. 1964 May;60:759-76.
- Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med*. 2005 Apr 25;165(8):891-7.
- Greiner O, Day PJ, Bosshard PP, Imeri F, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3129-34.
- Greiner O, Day PJ, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1386-90.
- Curran T, Coulter WA, Fairley DJ, McManus T, Kidney J, Larkin M, et al. Development of a novel DNA microarray to detect bacterial pathogens in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Microbiol Methods*. 2010 Mar;80(3):257-61.
- Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest*. 2000 Dec;118(6):1557-65.
- Groenewegen KH, Wouters EF. Bacterial infections in patients requiring admission for an acute exacerbation of COPD; a 1-year prospective study. *Respir Med*. 2003 Jul;97(7):770-7.
- Monso E, Garcia-Aymerich J, Soler N, Farrero E, Felez MA, Anto JM, et al. Bacterial infection in exacerbated COPD with changes in



- sputum characteristics. *Epidemiol Infect.* 2003 Aug;131(1):799-804.
26. Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest.* 2000 May;117(5 Suppl 1):286S-91S.
  27. Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, et al. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 May;157(5 Pt 1):1498-505.
  28. Sethi S. The Role of Antibiotics in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2003 Feb;5(1):9-15.
  29. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):336-63.
  30. May JR. The bacteriology of chronic bronchitis. *Lancet.* 1953 Sep 12;265(6785):534-7.
  31. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 2001 Jun;17(6):1112-9.
  32. Blasi F, Damato S, Cosentini R, Tarsia P, Raccanelli R, Centanni S, et al. Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. *Thorax.* 2002 Aug;57(8):672-6.
  33. Murphy TF, Brauer AL, Grant BJ, Sethi S. Moraxella catarrhalis in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jul 15;172(2):195-9.
  34. Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest.* 1999 Jul;116(1):40-6.
  35. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H. Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest.* 1998 Jun;113(6):1542-8.