

ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNİN İNCELEMESİNDE GRAM BOYAMANIN ÖNEMİ

THE IMPORTANCE OF GRAM STAIN IN THE EXAMINATION OF LOWER RESPIRATORY SPECIMENS

Güneş ŞENOL Can BİÇMEN

İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Gram boyama, alt solunum yolu örnekleri, pnömoni, tanı

Key Words: Gram stain, lower respiratory tract specimens, pneumonia, diagnosis

ÖZET

Klinik, radyolojik ve rutin laboratuvar bulguları pnömoniye yol açan etken konusunda ipuçları verebilir, ancak spesifik etyolojik tanı için mikrobiyoloji laboratuvarının yeterli katkısı gerekir. Tanısal testlerin pnömonili hastaların sağaltımının yönlendirilmesinde yararı olup olmadığı tartışmalıdır. Bu çalışmada 2322 balgam örneğinin Gram boyama ve kültür sonuçlarının karşılaştırılarak alt solunum yolu infeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında Gram boyamanın tanıya katkısı vurgulanmakta ve ancak deneyimli uzmanların belirli kriterlere uyararak yorum yapması ile pnömonili hastaların tanısal değerlendirilmelerine akılcı yaklaşılabilirliği ileri sürülmektedir.

SUMMARY

Clinical, radiographic and routine laboratory features of pneumonia can offer clues to the etiologic agent of the infection, but a specific etiologic diagnosis requires the assistance of the microbiology laboratory. Diagnostic tests are controversial in the management of pneumonia. In this study, the importance of the Gram stain in microbiologic diagnosis of lower tract infections is emphasized by comparing Gram stained preparations of 2322 sputum samples with cultures and it is suggested that a reasonable approach to the diagnostic evaluation of pneumonia is attained only when interpreted according to criteria by an experienced bacteriologist.

GİRİŞ

Alt solunum yolu örneklerden patojen organizmayı çabuk tanımak için birkaç yöntem vardır. Balgamın Gram boyaması, hem balgamın kalitesini hem de ortamda egemen olan bakteri yapılarını yansıtan, hızlı, ucuz, basit bütün hızlı yöntemlerin içinde en kullanışlı olanıdır. Tanımlandığı 1883'ten hemen sonra pnömoni tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Etkenin cinsi açısından yönlendirici ve ampirik tedavide klinisyene iyi bir yol göstericidir (1, 2).

Solunum yolunun bakteri infeksiyonlarında balgam kültürüne dayalı tanı yöntemlerinin değeri sınırlıdır. Bunun

en önemli nedeni, solunum yolu florasının çok zengin olması ve bu floranın hastanın çıkardığı balgama az veya çok bulaşmasıdır. Balgamın oral flora ile bulaşmamış olma olasılığı %25'tir (3). Orofarinkste yaklaşık 200 farklı cins anaerop, fakültatif anaerop veya aerop bakteri bulunur. Tükürükte 10^8 ml olan bakteri yoğunluğu dış çevresindeki jirjival ceplerde 10^{12} ml'ye kadar çıkabilir (4). Hastanın balgam çıkarmaması veya kaliteli olmayan balgam çıkarması da bakteriyolojik tanıdaki engellerden biridir. Gerçekten de atipik pnömonili ve dehidrate hastalar hiç balgam çıkaramayabilirler.

Laboratuvarlar örneklerin Gram boyama özelliklerine bakarak nispeten klinik işe yararlılıklarını saptayabilirler. Balgam yaymalarının küçük büyütme ile taranması örneğin uygunluğunu ortaya koyar. Orofaringeal epitel hücre sayısının polimorf çekirdekli lökosit (PNL) sayısına oranına göre bir skor belirlenir. Her küçük büyütme alanında (x10) 25'in üzerinde PNL, 10'un altında epitel hücresi olan balgamlar çalışmaya uygun örneklerdir. Çok lökositin olması örneğin değerlendirilebilir olduğunu işaret etmez. Her küçük büyütme alanında (x10)>10 epitel içeren örnekler incelemeye alınmaz. Klinisyen durumdan haberdar edilir ve yeni örnek istenir. Gram boyalı preparatın immersiyon objektifi ile incelenmesiyle bakterinin karakteri tanımlanır. Gram reaksiyonu, morfolojisi, doku, inflamatuvar hücre ve mikroorganizma düzenlenmesi, örneğin, tipi klinisyene enfeksiyonun ciddiyeti ve organizmaların önemi konusunda ipuçları verir. Lökositler, hastalığın erken veya geç döneminde, lökopenik hastalarda veya ortamda lökotosik mikroorganizma varsa, az sayıda bulunabilir. Çok çeşitli mikroorganizmaların varlığında ortamda epitel hücreleri olsa da olmasa da flora elemanları ile kontaminasyon düşünülebilir (5). Bu kriterler pnömonin varlığını veya yokluğunu saptamada değil, pnömoneye neden olan etyolojik ajanın doğru tanıya yardım etmesi içindir (6).

Pozitif balgam kültürü de pnömone tanısında en güvenilir testtir, ancak Gram boyamadan bağımsız değerlendirilmemelidir (7). Klinik örneklerde görülen egemen organizmalar kültürde üremez ise anaerobik, nazik veya antibiyotik-hasarlı bakterilere işaret edebilir (5). Yaymaları kültür kriterlerine uygun balgamlarda Legionella, Chlamydia, Mycoplasma veya Mycobacteria da araştırılması önerilir (8).

Bu çalışmada, poliklinik hastası veya hastanede yatan hasta ayırımı yapmadan, klinik ve radyolojik olarak alt solunum yolu (ASY) enfeksiyonu düşünülen hastalardan, ideal uygunlukta gönderilen balgamların etyolojik tanıya katkılarını, uygunluktan uzak örneklerin kültür sonuçlarının ise nasıl sapma gösterebileceği araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Laboratuvara tüberküloz dışı bakteriyel inceleme için gelen balgam örneklerinin makroskobik olarak uygun görülenlerinden önce lam üzerinde yayma yapıldı. Havada kuruyan yaymalar ateşte tespit edilip Gram boyama yöntemi ile boyandı. Gram boyanan her preparat, gelen materyalin Gram preparatının kültür ile uyumunun test edilmesi için nonspesifik kültüre alındı. Ekimler kanlı agar, EMB agar ve at kanlı çukulata agara yapıldı. Ekim alanının birinci veya ikinci çaprazlama bölgesinde saf kültür veya egemen olarak üreyen bakteriler enfeksiyon

etkeni olarak tanımlandı. Atipik mikroorganizmalar (Legionella, Mycoplasma, Chlamydia) ve anaerob bakteriler çalışma sınırları dışında bırakıldı.

Balgam örnekleri Gram boyamada saptanan epitel ve lökosit yoğunluğuna göre altı ayrı gruba ayrıldı. Tablo 1'de de izlendiği gibi, lökosit sayısı x10 büyütmede her alanda 10'un altında, epitel sayısı 25'in üstünde olan balgamlar birinci grup; lökosit her alanda 10-25 arasında kalan balgamlar dördüncü grup; lökosit sayısı 25'in üzerinde ve epitel yoğunluğu 10'un altında olanlar beşinci grup ve son olarak lökosit yoğunluğu 10-25 arasında kalırken epitel sayısı 10'un altında olan balgamlar altıncı grup olarak gruplandırılmışlardır.

BULGULAR

Aralık 1998-Haziran 2000 tarihleri arasında olmak üzere 2322 balgam örneği incelendi. Hasta grubu 445'i kadın ve 1877'si erkek yetişkinden oluşmuştur.

Toplam 2322 balgam örneğinin 880'inde (%37.8) mikroskobide egemen olarak izlenen etkenler üredi. Yirmi-altı (%1.1) örnekte ise mikroskobide izlenen mikroorganizmalardan farklı morfolojide bir bakteri üredi veya hiç üreme olmadı. Geride kalan 1416 (%60.9) balgamda saptanan üreme orofaringeal flora bakterilerinin karışık üremesi olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi, epitel sayısının 25'in üzerinde olduğu balgam yayması gruplarında hemen bütün kültürlerde flora elemanlarının özellik göstermeyen üremeleri izlenmiştir. İzlenen az sayıda bakteri kolonizasyonunun sadece iki tanesi Gram boyama preparatında görülen egemen bakteri morfolojisi ile uyumlu bulunmuştur. Toplam 2322 balgam örneği içinde sadece 61 (%2.6) tanesinin epitel hücresi 25'in üzerinde saptanmıştır. Epitel hücre sayısının 10-25 arasında kaldığı dördüncü grupta 57 balgamın 38'inde flora elemanları üremiş, ancak 18 balgamda mikroskobilerinde de izlenen 20 tane etken izole edilmiştir. Beşinci ve altıncı gruplara gelindiğinde, incelemeye alınan balgam sayısında büyük oranda artış olduğu görülmektedir. Beşinci grupta flora bakterilerinin üremesi o grupta incelenen balgam sayısına oranı %52'de kalmıştır. Bu grupta çalışan 501 balgamdan toplam 514 etken izole edilmiş, iki balgamda saptanan üreme mikroskobileri ile uyumlu olmamıştır. Bu oran tüm gruplar içinde ulaşılan en iyi sayıdır. Altıncı grupta ise flora bakterilerinin üreme oranı %66'ya yükselmiştir. Üçyüzdoksan balgam örneğinde patojen saptanmış, bu örneklerin 30'unda birden fazla etken, patojen olarak değerlendirilmiştir. Yirmi-iki balgamda izlenen üreme mikroskobisi ile uyumlu bulunmamıştır. Üreyen bakteriler gözönüne alındığında beşinci grupta en fazla

oranda üreme, sırasıyla, *Pseudomonas* (%23.8), *Haemophilus* (%18), *Moraxella* (%13.3), *Acinetobacter* (%11.9) ve *S. pneumoniae* (%11.7) türlerinde olmuştur. Altıncı grupta ise yine en fazla izole edilen etken *Pseudomonas* (%21.6) olmuştur. Sıklık sırasına göre izole edilen diğer bakteriler ise *Acinetobacter* (%17.7), *Moraxella* (%14.3) ve *Haemophilus* (%13) kökenleri olarak izlenmiştir. Bu grupta, *S. pneumoniae* izolasyon oranı %7.5'a gerilemiştir.

TARTIŞMA

Alt solunum yolu infeksiyonlarında balgamın incelenmesi ile alınan sonuçlar sınırlıdır. Bunun nedeni, balgamın çıkarılması sırasında büyük oranda nazofarinks ve oral flora ile karışmasıdır. Klinikte bağlantılı olarak ve belirli kurallara uyularak değerli sonuçlar alınabilir (5).

Kliniklere düşen en önemli görev, uygun örneğin doğru etiketlenerek laboratuvara zamanında ulaştırılmasıdır. Laboratuvarda da yapılması gereken ilk işlem, örneklerin uygunluk açısından makroskopik olarak gözden geçirilmesidir. Uygun olmayan balgam örnekleri kesinlikle incelenmemelidir. Laboratuvara tüberküloz dışı bakteriyel incelemeler amacıyla günde ortalama 15-25 balgam örneği girmektedir. Laboratuvara gelen balgamlar ilk

aşamada makroskopik olarak değerlendirilip kaliteli olmayan, tükürükten ibaret, içinde yiyecek artıkları ve başka yabancı cisimler bulunan balgamlar hiç işleme alınmamaktadır. Gönderilen balgamlar bu nedenlerden dolayı günler arasında ortalama %20-45 oranında geri çevrilmektedir. Buna karşın klasik kriterleri taşıyan beşinci grupta kalan balgamların kabul edilen balgamlara oranı %45 olabilmektedir. Çalışmalar, değişik yöntemler kullanılsa bile laboratuvara kabul edilen tüm balgam örneklerinin %28-75'inin kültüre uygun olmayacağını göstermektedir (7). Glekman ve ark. (9) bakteriyel pnömonili 144 hastanın 59'undan (%41) uygun özellikte balgam alabilmişler ve bu 59 balgamın 47'sinde (%79) egemen bakteri morfoloji ayırdetmişlerdir. Antibiyotik seçiminin geniş bir hasta kısmında Gram boyamaya bakılarak yapılabileceğini önermektedirler. Başka çalışmalar ise pnömonili hastaların %54-94'ünün balgam çıkarabildiğini, bunların %36-73'ünün kontaminasyon ve pürülans açısından mikroskopik kriterlere uyduğunu göstermektedir (7).

Bu çalışmada örnekler altı gruba ayrılmıştır. Sonuçlar, her grubun hem kendi içinde hem de diğer gruplarla karşılaştırılarak değerlendirildi. İncelenen 2322 balgam örneği içinde epitel sayısı her alanda 25'in üzerinde olan

Tablo 1. İncelenen balgamların Gram boyama ve kültür sonuçlarına göre gruplara ayrılması

	Lökosit	Epitel sayısı	Balgam sayısı	Flora	Mikroskopi ile kültürün uyumlu olduğu balgam örneklerinin ve üreyen etkenlerin sayısı ve cinsleri	Mikroskopi ile uyumsuz kültürlerde üreyen etkenlerin sayısı ve cinsleri
1	<10	>25	13	13	-	-
2	10-25	>25	33	30 (%91)	Pnömonok: 1 <i>Moraxella</i> : 1 (2 balgam örneği)	<i>Klebsiella</i> : 1, <i>Acinetobacter</i> : 1 (Tek balgam)
3	>25	>25	15	15	-	-
4	>25	10-25	57	38 (%66)	18 balgam örneği (%31.5) 20 izolat* * 1 <i>P. mirabilis</i> , 5 <i>Moraxella</i> , 2 <i>Acinetobacter</i> 2 <i>Pseudomonas</i> , 5 <i>Klebsiella</i> , 2 pnömokok, 4 <i>S. aureus</i> , 1 <i>Candida</i> , 3 enterokok	1 <i>Moraxella</i> , 1 <i>Candida</i> (Tek balgam)
5	>25	<10	1050	549 (%52)	499 balgam örneği (%47.5) 511 izolat** ** 31 <i>Klebsiella</i> , 25 <i>S. aureus</i> , 122 <i>Pseudomonas</i> , 92 <i>Haemophilus</i> , 68 <i>Moraxella</i> , 9 <i>Candida</i> , 13 <i>E. coli</i> , 2 <i>P. mirabilis</i> , 61 <i>Acinetobacter</i> , 60 pnömokok 8 <i>S. viridans</i> , 16 <i>Enterobacter</i> , 3 enterokok, 1 <i>Morganella</i> sp.	2 balgam örneği 1 <i>Ps</i> , 1 <i>Candida</i> , 1 pnömokok
6	10-25	<10	1154	771 (%66)	361 balgam örneği (%31.2) 384 izolat*** ***83 <i>Pseudomonas</i> , 20 <i>S. aureus</i> 68 <i>Acinetobacter</i> , 55 <i>Moraxella</i> , 33 <i>Klebsiella</i> 29 pnömokok, 50 <i>Haemophilus</i> , 20 <i>Enterobacter</i> , 2 <i>S. viridans</i> , 7 <i>E. coli</i> , 13 <i>Candida</i> , 1 enterokok, 1 <i>P. vulgais</i> , 1 <i>P. mirabilis</i> , 1 A grubu beta-hemolitik streptokok	22 balgam örneği (%1.9) 29 izolat 6 <i>Klebsiella</i> , 5 <i>Acinetobacter</i> 4 <i>Moraxella</i> , 4 <i>Pseudomonas</i> , 2 pnömokok, 2 <i>Enterobacter</i> , 2 <i>Haemophilus</i> , 2 <i>Candida</i> , 2 <i>Aeromonas</i> , 2 MRSA, 1 <i>S. aureus</i> 1 enterokok

(Yüzde oranları her grupta incelenen balgam sayısının o grupta üreyen bakterilere oranıdır).

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

(1, 2 ve 3. gruplar) sadece 61 (%2.6) balgam örneğinin olması, laboratuvarında klinik örneklerin laboratuvara kabulü sırasında çıplak gözle makroskopik olarak değerlendirmenin işe yaramayan örneklerin işleme alınmasını önemli oranda önlediği izlenimi vermektedir. Epitel hücre sayısının 10-25 arasında kaldığı 4. grupta, Gram boyalı preparata bakılarak öngörülen bakteri üremesi işleme alınan balgam sayısına oranla artmaya başlamıştır. Bir önceki grupta da lökosit sayısı her alanda 25'in üzerinde olmasına karşın bu grupta anlamlı üremenin olması epitel hücresi yoğunluğunun flora elemanlarının kültüre bulaştığını gösteren önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Ayrıca işleme kabul edilen balgam sayısının önceki gruplara göre biraz daha fazla olması, epitel hücresi yoğunluğunun azalmasıyla birlikte lökosit sayısının artmasının balgam pürülansını arttırdığı ve makroskopik değerlendirmenin zorlaştığını, bu nedenle bu gruptan itibaren Gram yayma preparatlarının balgamın kalitesinin saptanması açısından öneminin arttığı izlenmektedir. Beşinci grup ideal olarak epitel sayısı her alanda 10'un altında ve lökosit sayısı 25'nin üstünde olan uygun balgam örneklerinden oluşmuştur. Mikroskopi ile uyumlu üremenin uyumsuz üremeye oranı belirgin derecede fazla olmuştur. Kültür sonuçları ile en iyi korelasyon da bu gruptadır. Lökosit yoğunluğunun azaldığı altıncı ve son grupta flora elemanlarının üreme oranı yine artış göstermiştir. Bu grupta dikkati çeken, mikroskopi ile uyumsuz üreme sayısında artış olması ve aynı hastadan birden fazla etken izole edilmesidir. Beşinci ve altıncı gruplarda üreyen ve mikroskopide de görülmüş olan etkenler daha çok Gram-negatif infeksiyonlar yazarların çalıştığı hastanenin florasının ve hasta popülasyonunun (yaşlı, kemoterapi alan, uzun süre yatan ve yoğun bakım hastaları) bir özelliğidir. Altıncı grupta dikkat çeken başka bir nokta, pürülansın azalması ile birlikte, *S. pneumoniae* başta olmak üzere, *Haemophilus* ve *Moraxella* grubunun hem Gram boyamada egemenliklerini yitirmeleri hem de izolasyon oranının düşmüş olmasıdır.

Bu konuda yapılan bir çalışmada (10); 224 uygun balgam örneğinde 1/3 balgamda boyamada görülen bakteriler ile kültürde üreyen bakteriler uyum gösterdiği, üreme olup da yayma ile zayıf uyum gösteren bakterilerin Gram-negatif basiller özellikle *H. influenzae* olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada *Haemophilus* grubu bakterilerin üreme ve yayma ile uyumları oldukça iyi olarak izlenmiştir. *Haemophilus influenzae* üreyen balgamların beşinci grupta olanlarının hepsinde, altıncı gruptakilerde ise 52 örneğin 50'sinde Gram boyamada *Haemophilus* türü bakteri morfolojisinde mikroorganizmalar egemen olarak izlenmiştir.

Balgam dışında endotrakeal aspiratların mikroskopik bakışının üreyecek bakterinin kolonizasyon veya infeksiyon etkeni olduğunu göstermesi açısından etkili olduğu düşünülmüştür (11). Trakeal aspiratların Gram boyamasının antibiyotik seçiminde rehber olup olamayacağını saptamak için yapılan bir çalışmada (12), kültür-gram boyama uygunluğu ortalama %52-56 bulunmuştur. Gram-negatif basillerin görüldüğü yaymaların kültürle uyumu %89-91, Gram-pozitif kokların %33-35 olduğu saptanmıştır. Gram-pozitif kokların neden olduğu infeksiyonda Gram boyama dışında başka klinik bulgulara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür (12). Rein ve ark. (13) balgamda Gram-pozitif lanset biçimli diplokokların bulunmasının *S. pneumoniae* varlığını %48 duyarlılık ve %100 özgüllük ile gösterdiğini bulmuşlardır. Herhangi bir Gram-pozitif diplokokun varlığı pnömokok tanısı için daha duyarlı, ancak daha az özgüldür. Birçok çalışmada balgamda Gram-pozitif diplokok varlığının pnömokok pnömonisi tanısı için yüksek özgüllüğü olduğu söylenmektedir (7). Bunun yanında, bir başka çalışmada (14); post-travmatik nozokomiyal pnömonili hastalarda nozokomiyal pnömoni ve post-travmatik inflamatuvar yanıtı ayırtılabilmek ve gereksiz yere antibiyotik tedavisinin uzamasını engellemek için BAL yapılmıştır. Kültür sonuçları çıkana kadar Gram-boyama ile sonuçlar kestirilmeye çalışılmıştır. Gram-pozitif bakteri pnömonisi olan hastaların %80'inden, Gram-negatif pnömonisi olan hastaların %40'ından Gram-pozitif basiller; Gram-pozitif bakteri pnömonisi olan hastaların %52'sinden ve Gram-negatif pnömonisi olan hastaların %77'sinden Gram-negatif bakteriler üremiştir. Bu çalışmada kültür ile Gram boyamanın uyumu iyi bulunmamıştır (14).

Birçok çalışmada balgamın Gram boyamasının yararının farklı yorumlandığı görülmektedir. Klinisyeni yanıltan sonuçlar da verebileceği için örneğin alınmasından boyama ve kültürün değerlendirilmesine kadar yapılan işlemlerin standardize edilmesi gereklidir. Bu noktada iyi bir laboratuvar-klinik işbirliği kadar, gerçekten de değerlendiren kişinin bilgi ve deneyimi önem kazanmaktadır. Değerlendiren kişiye bağlı olarak farklı durumlarda özgüllük ve duyarlılığın değiştiği görülmektedir. Merill ve ark. (15) pnömokları tanımda deneyimli laboratuvar çalışanlarının klinik hekimlerinden daha başarılı olduğunu ortaya koymuştur.

Pnömonilerde maliyet-yarar açısından bakıldığında, ampirik tedavinin blirlenmesinde ve komplikasyonların önceden kestirilmesinde bir çok otorite birinci basamakta göğüs radyogramı ile birlikte Gram boyama ve kültürün yapılmasını önermektedir (16). Kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut atağında atağın bakteriyel olup olmadığı konusunda en yararlı inceleme Gram boyama ile yapılır (17). IDSA Amerikan İnfeksiyon Hastalıkları

Derneği (IDSA) bütün hastalıklarda olanakların olduğu hastalarda Gram boyama ve balgam kültürünün yapılmasını önermektedir (18). Balgam boyamasının değerlendirilmesi hem balgam kalitesini hem de içerdiği mikroorganizmaların görülebildiği için ampirik antibiyotik tedavisine rehberlik eder ve balgam kültürünün değerlendirilmesine yardımcı olur (9). Gram boyama ve sonra yapılan balgam kültürü ve antibiyogramı gibi noninvazif testler gereksiz yere yeni çıkan pahalı antibiyotiklerin rutin kullanımının gereksizliğini ve konvansiyonel geniş spektrumlu antibiyotiklerin tedavide hala yerlerini koruduklarını gösterebilir (20).

Sonuç olarak, bu çalışmada mikroskopik kriterlere en fazla sadık kalınan grupta Gram boyama ve kültür sonuçlarının korelasyonu en iyi bulunmuştur. Pürülansın azaldığı örneklerde solunum yoluna özgü patojen bakterilerin (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*) ayırd edilmesi olasılığı azalmıştır.

Uygun örneklerin işlendiği durumlarda tanı ve tedaviye iyi rehberlik edecek basit, kolay ve ucuz bir yöntem olan Gram boyamasının kültüre alınacak tüm alt solunum yolu örneklerinde mutlaka yapılması gerekir. Kültür ve antibiyogram gibi noninvazif testlerin de koşulların uygun olduğu durumlarda uygulanması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Austrian R.** The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, a historical note. *Bacterial Rev* **1960**; 24: 261-4.
2. **Moellering RC.** Principles of anti-infective therapy. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, **1995**: 199-200.
3. **Ekim N, Köktürk O, Arseven ve ark.** Toplum kökenli pnömoni: Tanı ve tedavi rehberi. *KLİMİK Derg* **1998**; 11 (Özel Sayı): 4-10.
4. **Ryan KJ, Smith KF, Wilson WR.** *Laboratory Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections*. Cumitech 7A. Washington, DC: ASM Press, September **1987**: 1.
5. **Bilgehan H.** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir: Güneş Yayınevi, **1995**: 337-41.
6. **Chapin K.** Clinical microscopy. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microscopy*. 6th ed. Washington, DC: ASM Press, **1995**: 41-2.
7. **Skerrett SJ.** Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. *Clin Chest Med* **1999**; 20: 531-48.
8. **Isenberg HD, Schoenkecht FD, Graevenitz A.** *Collection and Processing of Bacteriological Specimens*. Cumitech 9. Washington, DC: ASM Press, **1979**: 4-5.
9. **Gleckman R, DeVita J, Hbert D, Pelletier C, Martin R.** Sputum Gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia. *J Clin Microbiol* **1988**; 26: 846-9.
10. **Minocha A, Moravec Jr CL.** Gram's stain and culture of sputum in the routine management of pulmonary infection. *South Med J* **1993**; 86: 1225-8.
11. **Albert S, Kirchner J, Thomas H, Behne M, Schur J, Brade V.** Role of quantitative cultures and microscopic examinations of endotrachea aspirates in the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. *J Hosp Infect* **1997**; 37: 25-37.
12. **Namias N, Harvill S, Ball S, McKenney MG, Sleeman D, Ladha A, Civetta J.** A reappraisal of the role of Gram's stains of tracheal aspirates in guiding antibiotic selection in the surgical intensive care unit. *J Trauma* **1998**; 44: 102-6.
13. **Rein MF, Gwaltney JM, O'Brien WM, Jennings RH, Mandell GL.** Accuracy of Gram's stain in identifying pneumococci in sputum. *JAMA* **1978**; 239: 2671-3.
14. **Sethi S.** Infectious exacerbations of chronic bronchitis: diagnosis and management. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 43 (Suppl A) (-HD-): 97-105.
15. **Merrill CW, Gwaltney JM, Hendley JO, Sande MA.** Rapid identification of pneumococci. Gram stain vs. the Quellung reaction. *N Engl J Med* **1973**; 288: 510-2.
16. **Rubins JB, Janoff EN.** Tailoring management of adult patients according to risk category. *Postgrad Med* **1997**; 102: 45-62.
17. **Orhan Arseven.** Kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut atağında infeksiyonların rolü ve tedavi. *KLİMİK Derg* **1996**; 9: 119-23.
18. **Bernstein JM.** Treatment of community-acquired pneumonia-IDSA guidelines. Infectious Diseases Society of America. *Chest* **1999**; 115 (Supp 3): 9-13.
19. **Reimer LG, Carroll KC.** Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* **1998**; 26: 742-8.
20. **Plouffe JF, McNally C.** Value of noninvasive studies in community-acquired pneumonia. File TM. *Infect Dis Clin North Am* **1998**; 12: 689-99.