

70514

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOSERVİKAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE
CHLAMYDIA TRACHOMATIS HÜCRE KÜLTÜRÜ
SONUÇLARININ DİREK FLORESAN ANTİKOR (DFA)
VE ENZİM İMMUNOASSAY (EIA) YÖNTEMLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN : Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR

İZMİR-1998

TEŐEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim s¼recinde değerli katkılarında dolayđı danıőmanım Prof. Dr. İ. Hakkı Bahar'a, verdikleri eğitim ve sağladıkları olanaklarla yetiőmemde emeklerini asla unutamayacağım değerli hocam ve anabilim dalı baőkanım Prof. Dr. Nuran Yuluğ'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Vedat Orhan, Prof. Dr. Nedim akır, Prof. Dr. Ayőe Y¼ce, Doç. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu, Doç. Dr. Zeynep G¼lay, Doç. Dr. Mine Y¼cesoy, Oğr. G¼rv. Dr. Őzlem Yılmaz, ve artık aramızda bulunmayan, her zaman saygı ve Őzlemlerle andığım Doç. Dr. Ergun Őaőmaz'a, tez çalıőmamda olgu grubuna ulaőmamda sağladığı yardımlarla Prof. Dr. Ata Őnvural'a, teknik bilgi ve yardımlarında dolayđı Doç. Dr. Deniz Dereli'ye iten teőekk¼rlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|-------------------------|--------------|
| Tablo Listesi | 3 |
| Şekil Listesi | 4 |
| Fotoğraf Listesi | 4 |
| Grafik Listesi | 4 |
| Kısaltmalar | 5-6 |
| 1. Özet | 7 |
| 2. Summary | 8 |
| 3. Giriş ve Amaç | 9-11 |
| 3.1 Giriş | 9-10 |
| 3.2 Amaç | 11 |
| 4.Genel Bilgiler | 12-32 |
| 4.1 Biyoloji | 12-19 |
| 4.2 Epidemiyoloji | 19-22 |
| 4.3 Klinik | 22-24 |
| 4.4 Laboratuvar Tanı | 24-32 |
| 4.5 Sağaltım | 32 |

| | |
|---|--------------|
| 5. Gereç ve Yöntem | 33-43 |
| 5.1 Olgu Seçimi ve Örnek Alımı | 33-34 |
| 5.2 DFA ile Antijen Aranması | 34-36 |
| 5.3 EIA ile Antijen Aranması | 36-38 |
| 5.4 Hücre Kültürü ile <i>C.trachomatis</i> Aranması ve Doğrulanması | 39-43 |
| 5.5 Deney Sonuçlarının Analizi | 43 |
| 6. Bulgular | 44-54 |
| 7. Tartışma | 55-67 |
| 7.1 Görülme Sıklığı | 55-58 |
| 7.2 Antibiyotik Kullanımının Test Sonuçları Üzerine Etkileri | 58 |
| 7.3 Yöntemlerle İlgili Uygulamada Karşılaşılabilecek Sorunlar | 59-63 |
| 7.4 DFA Sonuçlarının Karşılaştırmalı Çözümlemesi | 63-64 |
| 7.5 OIA Sonuçlarının Karşılaştırmalı Çözümlemesi | 65-67 |
| 8. Sonuç ve Öneriler | 68 |
| 9. Kaynaklar | 69-80 |

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olgularda Test Sonuçlarının Yaş, Klinik Yakınma ve Bulgularla Karşılaştırılması.....Sayfa 45

Tablo 2: DFA, OIA ve Hücre Kültürü ile Elde Edilen Sonuçlar.....Sayfa 46

Tablo 3: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olguların Klinik Öntanı ve Yakınmalarının Test Sonuçlarının Karşılaştırılması.....Sayfa 50

Tablo 4: DFA, OIA ve Hücre Kültürü Toplu Sonuçları.....Sayfa 52

**Tablo 5: DFA ve OIA Sonuçlarının Referans Yöntemle Karşılaştırılması
..... Sayfa 53**

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1: *C.trachomatis* Gelişim Döngüsü.....13**
- Şekil 2: *C.trachomatis*'in Hücre Yapısı ve Antijenleri.....16**
- Şekil 3: OIA Deneyinde Olası Sonuçlar ve Değerlendirilmeleri.....38**

FOTOĞRAF LİSTESİ

- Fotoğraf 1: McCoy Hücre Serisinde *C.trachomatis* İnküzyonları (x400).....47**
- Fotoğraf 2: McCoy Hücre Kültüründe Üretilmiş İnteritoplazmik *C.trachomatis* İnküzyonları (x1000).....48**
- Fotoğraf 3: *C.trachomatis*'in McCoy Hücre Kültüründeki Elementer Cisimcikleri (Okla İşaretli) ve Bir Büyük İnküzyon Cismi (x1000)....49**

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olguların Yaşlara Göre Dağılımı.....51**
- Grafik 2: DFA ve OIA Testlerinin Karşılaştırılması.....54**

KISALTMALAR

BMGK: Buffalo yeşil maymun böbrek hücresi

CBP: Hücreye bağlanma proteini

CDC: Hastalık kontrol merkezi

ClGH: Cinsel ilişki ile geçen hastalıklar

CTM: Klamidiyal taşıma ortamı

DFA: Direk floresan antikor

DNA: Deoksiribonükleik asit

EIA: Enzim immunoassay

EMEM: Eagle minimal esansiyel ortamı

FBS: Fetal bovin serum

FITC: Florosein isotiyosiyanat

GM: Üretim ortamı

GN: Gerçek negatif

GP: Gerçek pozitif

HIV: Human immunodeficiency virus

HSPs: Isı şok proteinleri

IgA: İmmunglobulin A

IgG: İmmunglobulin G

IgM: İmmunglobulin M

LCR: Ligaz zincir reaksiyonu

LGV: Lenfogradüloza venereum

LPS: Lipopolisakkarid

MIF: Mikro immunofloresan

MOMP: Major dış zar proteini

NPD: Negatif prediktif değer

OIA: Optik immunoassay

OMP: Dış zar proteini

ORF: Open reading frame

PBS: Fosfat tampolu tuz

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PID: Pelvik inflamatuvar hastalık

PNL: Polimorfonükleer lökosit

PPD: Pozitif prediktif değer

RNA: Ribonükleik asit

YN: Yalancı negatif

YP: Yalancı pozitif

1. ÖZET

Cinsel ilişki ile geçen hastalıklardan en sık sorumlu patojen bakterinin *Chlamydia trachomatis*, olduğu bilinmektedir. Halen dünyada her yıl 50 milyon yeni *C.trachomatis* enfeksiyonu oluştuğu tahmin edilmektedir. Enfeksiyonun Türkiye'deki durumu ise henüz yeterince bilinmemektedir ve yeni, kapsamlı verilere gereksinim vardır.

Çalışmamızda, hızlı tanıda uygulanan antijen arama yöntemlerinden direkt floresan antikor (DFA) ile enzim immunoassay'a (EIA) dayalı bir teknik olan optik immunoassay (OIA) kullanarak sonuçlarını doğrulama yöntemi olan siklohekzimid uygulanmış McCoy hücrelerinin shell vial hücre kültürü sonuçları ile karşılaştırdık. 75 ıvegen veya süregen servisitli kadından 24 tanesinde (%32) hücre kültürü olumluluğu saptadık. İki tarama yöntemini duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri yönünden karşılaştırdık. Bu değerleri aynı sıra ile DFA için, %71, %100, %86, %100, OIA için %75, %86, %72, %88 olarak bulduk. Sonuç olarak laboratuvarımızdaki *C.trachomatis* taramasında OIA yöntemi ile belirgin olarak fazla hatalı pozitif sonuç bulunduğumuzdan ve OIA ile elde edilen sonuçların referans yöntemle doğrulanması gerektiğinden DFA yönteminin OIA'den daha etkin olduğunu bulduk ve DFA yönteminin *C.trachomatis* taranmasında OIA yöntemine yeğlenmesi görüşüne ulaştık.

2. SUMMARY

Chlamydia trachomatis (*C.trachomatis*) is known to be the most common bacterial sexually transmitted disease (STDs). Worldwide it is estimated that there are more than 50 million new cases annually. The status of *C.trachomatis* infection is not known in Turkey and we need a new wide data about the infection.

In this study we used two screening methods (Direct fluorescent antibody (DFA) and optical immunoassay based enzyme immunoassay technique) and one gold standart (Cycloheximide treated McCoy cell culture in the shell vials) method. We detected the *C.trachomatis* in 24 patients from 75 (%32) with cervical infection with cell culture method and compared two screening methods about sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV). We found the sensitivity, specificity, PPV, NPV, %71, %100, %86, %100, for DFA, and %75, %86, %72, %88, for OIA respectively. When the results were evaluated, it has been shown that DFA method more effective than OIA for the screening of *C.trachomatis* in our laboratory. Because OIA's have more false positive results and we have to confirm all positive results of OIA's with the reference methods.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

3.1. GİRİŞ

İnsanda infeksiyon oluşturan Klamidyalar, *Chlamydia trachomatis* (*C.trachomatis*), *C.pneumonia*, *C.psittaci* olmak üzere üç ana türde toplanmıştır. Yakın zamanda dördüncü bir tür olarak tanımlanan *C.pecorum*'un patojen özelliği açıklık kazanmamıştır (1).

C.trachomatis ilk kez 1907'de Halberstaedter tarafından trahom etkeni olan intraepitelial inklüzyonlarla özellenen mikroorganizmalar olarak bildirmiştir (2). Osser "1911'de nongonokokal oftalmiya neonatorumlu çocuklarda ve annelerinin servikal sürüntülerinde benzer inklüzyonların Lindner tarafından saptandığı" ve "1957 yılında trahomlu hastaların konjunktiva kazıntılarında embriyonlu yumurta sarı kesesinde Tang ve arkadaşları tarafından üretildiğini" bildirmiştir (3). 1965'te *C.trachomatis* ilk kez Gordon ve arkadaşları tarafından hücre kültüründe üretilmiştir (4). 1965-1969 yılları arasında yapılan çalışmalarda, önceden virus olduğu sanılan *C.trachomatis*'in replikasyonu, metabolizması, genetik materyali bakımından küçük, zorunlu hücre içi bir bakteri olduğu bildirilmiştir (5-8).

1970-1975 yıllarında geliştirilen mikroimmunofloresan (MIF) tekniği ile *C.trachomatis* kökenlerinin serotiplendirilmesi, klamidyal antikörlerin duyarlı ve özgül olarak ölçülmesi gerçekleştirilmiştir (9,10).

1975'te *C.trachomatis* 15 serovar olarak sınıflandırılmıştır; A, B, Ba, C trahom serovarı, D-K arası genital serovarlar, L1, L2, L3 ise

Lenfogramuloma venerum (LGV) serovarlarıdır. 1991'de Graystone ve Wang, Da, Ia, L2a, olarak üç yeni serovar daha bildirmiştir (11,12).

Son 20 yılda yapılan çalışmalar, *C.trachomatis*'in çok sayıda klinik hastalık ve sekellere yol açtığını göstermiştir. Özellikle cinsel ilişki ile geçen hastalıklar (CİGH) içinde *C.trachomatis*'in önemi dikkat çekici olmuş ve sanayileşmiş batı ülkelerinde gonokok infeksiyonlarını geçerek birinci sırada yer almıştır. Dünyada her yıl 50 milyon yeni *C.trachomatis* olgusu olduğu sanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Centers for Disease Control'un (CDC-hastalık kontrol merkezi) verilerine göre her yıl 4 milyon yeni *C.trachomatis* olgusu görülmektedir (13,14). Türkiye'de ise henüz *C.trachomatis* infeksiyonlarının toplum içindeki sıklığını gösteren kapsamlı bilgiler yoktur. İzmir ve İstanbul'da yapılan bazı çalışmalar bu bölgelerde hastalığın görülme sıklığı ile ilgili genel bilgiler vermektedir ancak bunların da yeni verilerle desteklenmesine gerek vardır (15-21).

C.trachomatis infeksiyonlarında yaşanan en önemli sorun tanı zorluğudur. Uygulanabilirliği zor, deneyimli bir ekip ve teknik donanıma gerek gösteren hücre kültürünün yanında günümüzde direk floresan antikor (DFA) ve enzim immunoassay (EIA) gibi yeni antijen arama yöntemleri de geliştirilmiştir. Piyasada birçok ticari EIA ve DFA kiti olmasına karşın bunların duyarlılıkları ve özgüllükleri özellikle kullanılan antikorlara göre değişmektedir (22-24).

3.2. AMAÇ

Bu çalışmada, klinik yakınması olsun ya da olmasın, ıvegen veya süregen servisit klinik tanısı alan kadınlarda;

1) *C.trachomatis* ile infeksiyon sıklığının en güvenilir yöntem olan hücre kültürü ile belirlenmesi

2) İnfeksiyonun yaş, klinik yakınma ve bulgularla ilişkisi

3) Hızlı tanıda kullanılan antijen arama yöntemleri olan EIA ve DFA'nın duyarlılık, özgüllük ve etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

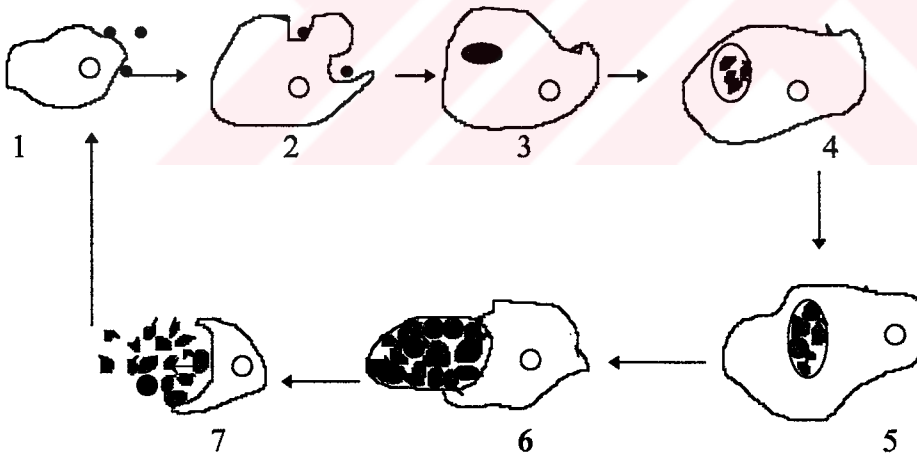
4.1. Biyoloji

C.trachomatis, zorunlu hücre içi paraziti olan bir bakteridir. Gelişimsel tipik hücre döngüleri klamidyaları diğer bütün mikroorganizmalardan ayırır. Bütün klamidyalar konak hücrenin sitoplazmasında çoğalarak ışık mikroskopisi ile tanımlanabilen intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturur. Klamidyalar hücre içi yerleşimleri nedeni ile uzun süre viruslar içinde anılmıştır ancak birçok özellikleri ile viruslardan ayrılır. Bunlardan başlıcaları; her iki nükleik asiti (DNA ve RNA) yapılarında bulundurması, gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısını anımsatan bir hücre duvarı bulunması, birçok geniş spektrumlu antibiyotiğe duyarlı olması ve birçok enzimlerinin bulunmasıdır. Klamidyalar, kendi metabolik yetileri ile enerji oluşturamazlar, bu nedenle konak hücrenin enerji kaynaklarından yararlanan enerji paraziti bakterilerdir(11).

Klamidyalar yaşam döngülerinde elementer cisim ve retiküler cisim olarak adlandırılan iki ayrı gelişim evresinde bulunurlar. Elementer cisim bakterinin hücre dışı formudur, 300-400 nm çaplı, metabolik olarak inaktif, bölünmeyen, koruyucu hücre duvarına sahip, infeksiyöz formdur. Elementer cisimler konak hücreyi infekte ettikten sonra retiküler cisimlere dönüşürler, 800-1000 nm çapında olan retiküler cisimler, infeksiyöz değildir ve yalnız hücre içinde yaşayabilir. Retiküler cisimler hücre içinde bölünerek elementer cisimlere dönüşürler (1).

4.1.1. Yaşam Döngüsü

Klamidyal infeksiyon döngüsü, elementer cisimin konak hücre yüzeyine yapışması ile başlar. Bu bağlanmanın oluşması ortamdaki canlı klamidya varlığına ve elementer cisim ile konak hücre yüzeyindeki yapıların etkileşimine bağlıdır. Buradaki etkileşim; hidrofobik ilişkiler ve elektrik yük özelliklerini içerir. 1992'de yapılan bir çalışmada *C.trachomatis*'in konak hücreyi yakalayabilmesi için hücre yüzeyinde heparan sülfat benzeri glikozaminoglikana gereği olduğu bildirilmiştir. Güçlü van der Waals bağları ile hücre yüzeyine bağlanan klamidya, reseptöre bağlı endositoza benzer bir mekanizma ile hücreye girer. Bundan sonra, elementer cisim endozoma geçer. İnfeksiyondan birkaç saat sonra elementer cisimin hücre duvarında belirgin değişim görülür ve kendilerinden 5-8 kat büyük olan retiküler cisimlere dönüşüm başlar (25,26). *C.trachomatis*'in gelişim döngüsü şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1- *C.trachomatis* Gelişim Döngüsü

1. Elementer cisimlerin hücre yüzeyine tutunması / 2. İçeri alınma / 3. Elementer cisimden retiküler cisime dönüşüm / 4. Retiküler cisimlerin yapışık olarak bölünmesi / 5. Retiküler cisimden elementer cisimlere olgunlaşma / 6. Endozom içinde retiküler cisimlerin yığılması / 7. Elementer ve retiküler cisimlerin salınması (27).

İnfeksiyondan yaklaşık 8 saat sonra retiküler cisimler ikiye bölünerek üremeye başlar, 20-30 saat sonra bir kısım retiküler cisim, sitoplazmasında yoğunlaşma oluşarak küçülür ve tipik elementer cisimlere dönüşür, diğer retiküler cisimler ise konak hücre sitoplazmasını hemen hemen dolduruncaya dek çoğalmayı sürdürerek klamidiyal inklüzyon cisimlerini oluşturur. Konak hücreden klamidyaların erkil kalış mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. İnfeksiyondan 40-50 saat sonra bütün infekte hücreler otolize olur ve infeksiyöz elementer cisimler ortama yayılır (27,28).

4.1.2. Antijenik Yapı

Klamidiyal elementer cisimlerin yüzeyleri karmaşık bir moleküler mozayik yapı gösterir. Bu yapı içinde cins, tür, tip özgül antijenler vardır. Klamidiyal antijenler; lipopolisakkarid (LPS), Major dış membran proteini (MOMP), Dış membran proteini2 (OMP2), Isı şok proteini 60 (HSP60), Isı şok proteini 70 (HSP70), Hücre bağlanma proteini (CBP), dış membran proteini (OMP)'dir (Şekil2).

Lipopolisakkarid (LPS) :

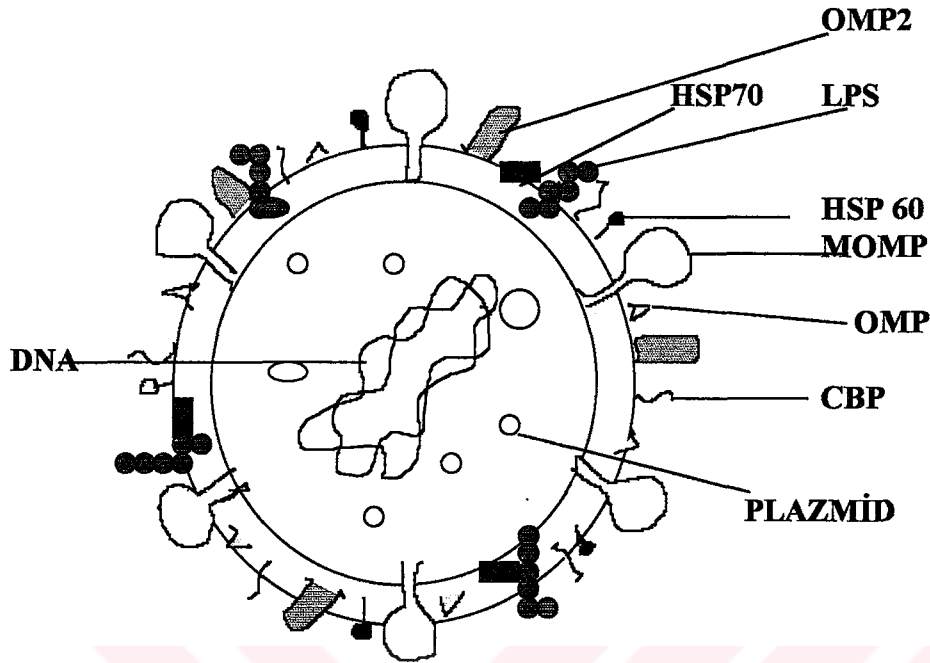
Klamidyaların ilk ve en geniş ölçüde çalışılan antijenik yapısı LPS'dir. LPS, cinse özgül olup yapısında yarı reaktif ketodeoksioktanoikasit bulunduran ısı stabil bir antijendir. *C.trachomatis* ve *C.psittaci* elementer cisimlerinden elde edilen LPS'nin kimyasal analizinde; D-glukozamin, uzun zincirli 3-hidroksi yağ asidi, 3-deoksi-D-manno-oktulonik asit (KDO) ve fosfattan oluştuğu gösterilmiştir. Bu antijenik yapı cinsin bütün üyelerinde

aynıdır ve buna karşı oluşan antikorlar enterobakteriyal bazı LPS'lerle çapraz reaksiyon verirler, ancak bu özellik serolojik tanıda bir değer taşımaz (29).

Dış membran proteinleri (OMP'ler) :

Klamidyal dış membranda üç ana protein yapı bulunmaktadır. Klamidyal hücre duvarının dış kısmında rijit bir peptidoglikan tabaka olmadığından, yapısal sağlamlık sisteinden zengin proteinler arasındaki çapraz disülfid bağları ile sağlanmaktadır (30).

MOMP'un moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 40.000 dir. İkinci dış membran proteininin molekül ağırlığı (OMP2) 60.000, üçüncü proteinin molekül ağırlığı ise 15.000 dir. MOMP bütün klamidyalarda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda MOMP'un cins, tür, alt tür ve serotip özgül determinantlar içerdiği bildirilmiştir (27). MOMP'a karşı oluşan antikorlar in vivo olarak elementer cisimlerin infektivitelerini nötralize eder. Klamidyal hücre duvarından saflaştırılan MOMP bir porin gibi görünür. Bütün MOMP genleri klonlanmış ve moleküler ağırlıkları, amino asit sekansları saptanmıştır. *C.trachomatis*'e (Serotip L2) ilişkin open reading frame (ORF) 1182 baz çiftinden oluşmaktadır ve 394 amino asit kodlamaktadır. L2'nin ilk 22 amino asidi ile 23-44'üncü amino asit sekansları aynıdır. İlk 22 aminoasit MOMP'un dış membrana yerleşmesini sağlayan sinyal sekansıdır. MOMP, 372 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı 40282'dir (31). *C.trachomatis* serotip B, C, L2'nin nükleotid ve aminoasit sekansları araştırılmış ve bu genlerin genellikle göreceli olarak benzer yapılı oldukları görülmüştür. Ancak yine de bu bölgelerde dört değişken sekans bulunmuştur bunlar; VDI, VDII, VDIII, VDIV'tür. *C.pneumonia*'nın, VDIV bölgesinin diğer türlerin aynı bölgeleri içinde en geniş yüksek değişken (hipervariable) bölge olduğu gösterilmiştir (32). Şekil 2'de *C.trachomatis*'in hücre yapısı ve antijenleri gösterilmektedir.



Şekil 2- *C.trachomatis*'in Hücre Yapısı ve Antijenleri

LPS: Lipopolisakkarid/ MOMP: Major dış membran proteini/ OMP2:Dış membran proteini 2/ HSP 60: Isı şok proteini 60/ HSP70: ısı şok proteini 70/ CBP: Hücre yapışma proteini/ OMP: Dış membran proteini (28).

Klamidyal aşı hazırlanmasında potansiyel antijen olarak görülmesi nedeniyle *C.trachomatis*'in MOMP'u ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bunun nedeni, MOMP'a karşı gelişen antikorların *invivo* ve *invitro* olarak infektiviteyi nötralize etmesidir. *C.trachomatis*'in L2 serotipinin MOMP'una karşı oluşan poliklonal antikorlar, serotip L2'nin elementer cisimlerinin HeLa hücrelerine olan infektivitesini nötralize etmektedir. Yine de bu antikorlar, elementer cisimlerin hücreye yapışmalarını ve penetre olmalarını engelleyemez. Bu antikorların infekte hücrelerdeki elementer cisimlerin yaşam döngülerini inhibe ettiği düşünülmektedir (34).

OMP2 klamidyaların ikinci dış membran proteini. Moleküler ağırlığı 60.000'dir. *C.trachomatis*'in L2 serotipine ait genin analizinde 1641 baz çiftlik bir ORF'nin kodladığı 547 aminoasitlik bir protein olduğu bulunmuştur (35).

Diğer dış membran proteininin moleküler ağırlığı yaklaşık 15.000 dir. Bu proteinin analizinde tür ve tipe özgül epitoplara bulunmuştur. Proteine karşı gelişen antikorların elementer cisimlerin üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür (36).

Isı şok proteinleri (HSP'ler):

Patojen mikroorganizmaların major antijeni olup otoimmün hastalıkların patogeneğinde de rol alan ısı şok proteinleri bütün klamidiya türlerinde bulunmaktadır. HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre; HSP90, HSP70, HSP60 ve ubiquitin olmak üzere dört gruba ayrılmışlardır. Bunlardan HSP70 ve HSP60, klamidyal elementer cisimlerde de bulunmaktadır (27).

HSP70'in geni 1956 nükleotid içeren ve 652 aminoasitlik 70588 molekül ağırlığında bir protein kodlayan ORF içerir. HSP60 geni ise 1632 nükleotid içerir ve 544 aminoasitlik 58.088 molekül ağırlığında bir proteini kodlar.

C.trachomatis'e ait HSP70 *Escherichia coli* ve *Bacillus megatorium*'un DnaK proteini ile yaklaşık %70 benzerlik gösterir. *C.psittaci*'ye ait HSP60 ise *Coxiella burnetti*'nin HtpB proteini, *E.coli*'nin GroEL proteini, *M.tuberculosis*'in 65.000 molekül ağırlıklı proteini ve *Saccharomyces cerevisiae* ile %50-60 benzerlik gösterir. *C.trachomatis*'e ait immunopatolojik yanıtla ilişkili HSP'ni kodlayan iki gen *C.pneumonia*'da da gösterilmiştir. HSP60 proteini hayvan modelinde trahoma bağlı gözdeki gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtını artırır. HSP70'e karşı oluşan antikorlar klamidyal infektiviteyi nötralize eder ancak gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtına neden olmazlar (37,38).

Hücre bağlayan proteinler :

Daha önce söz edildiği gibi elementer cisimlerin konak hücre yüzeyine bağlanmaları klamidyaların gelişim döngüsünün ilk basamağını oluşturur. *C.trachomatis*'in L2 ve J serovarları 18.000 ve 31.000 molekül ağırlıklı iki proteinle HeLa hücre zarına bağlanır. Hücre bağlayıcı proteinler yalnızca elementer cisimlerde bulunurlar, retiküler cisimlerde bulunmazlar. Bu hücre bağlayıcı proteine karşı oluşan antikorlar elementer cisimlerin infektivitesini nötralize eder (39). *C.trachomatis*'in 18.000 molekül ağırlıklı hücre bağlayıcı proteinini kodlayan gen klonlanmış ve sekanslanmıştır. Elde edilen rekombinant proteine karşı oluşan antikorların infektiviteyi nötralize ettiği bulunmuştur. Bu 18.000 molekül ağırlıklı protein "clanectin" dir (40).

4.1.3. Genom

Klamidyalar çift iplikli çembersel bir DNA'ya sahiptir ve büyüklüğü 600-1400 kilobaz çiftlik bir aralıktadır. Büyük bir molekül olan klamidyal DNA'yı elde etmek zordur bu nedenle "Pulse - field" jel elektroforezi kullanılarak klamidyal kromozom büyük DNA parçalarına bölünerek büyüklüğü saptanmaya çalışılır.

Başlıca üç klamidya türünün DNA yapıları farklıdır *C.trachomatis* kökenlerinin G+C oranları %45-45,5 arasında değişmekteyken *C.psittaci*'nin G+C oranları %41,5-42 arasındadır. Yapılan DNA hibridizasyon çalışmalarında klamidya türlerinin kökenleri arasında homolojinin yüksek olduğu bulunmuştur (%94-100). *C.trachomatis*, *C.psittaci*, *C.pneumonia* elementer cisimlerine ait DNA'ların çeşitli restriksiyon endonükleazları ile parçalanarak yapılan analizlerinde *C.trachomatis* ve *C.pneumoniae* türlerine ait kökenler arasındaki farklılıkların küçük olduğu bulunmuştur buna karşılık *C.psittacinin* kökenleri arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur. *C.psittaci*

kökenleri restriksiyon endonükleazlarının analizine dayanarak gruplara ayrılabilir.

Klamidya türlerinden yalnızca *C.trachomatis* ve *C.psittaci*'nin bazı kökenlerinde plazmid varlığı saptanmıştır. Klamidyal plazmid DNA'sı yaklaşık 7,4 kb büyüklüğünde ve klamidyal DNA'nın 1/100'ünden küçüktür. Her elementer cisimde 10 kopya kadar bulunmaktadır (27).

4.2. Epidemiyoloji

4.2.1 Dünya ve Türkiye'deki sıklık

Günümüzde *C.trachomatis* infeksiyonları iki farklı epidemiyolojik tabloda toplanırlar :

1- A, B, Ba ve C serovarları özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kırsal bölgelerde trahom (İnklüzyonlu konjuntivit) etkeni olarak infeksiyon oluşturur. Kuru ve sıcak iklim ile hijyen koşullarının sağlanamadığı durumlar bu infeksiyonun riskini arttırmaktadır. Önlenebilir körlük olarak bilinen trahom, genellikle kirli eller, ortak kullanılan kirli eşyalar ve kara sineklerle yayılan bir infeksiyondur (1).

2- D-K, L1, L2, L3 özellikle sanayileşmiş ülkelerde cinsel ilişki ile geçen hastalıklardan (CİGH) sorumlu tutulmaktadır. *C.trachomatis*'in bu ürogenital kökenleri, erkeklerde sıklıkla üretrit ve epididimit, kadınlarda ise servisit ve pelvik inflamatuvar hastalık oluşturmaktadır. Lenfogradüloz venerum (LGV) ise *C.trachomatis*'in etkeni olduğu diğer bir veneryan hastalıktır (1).

C.trachomatis infeksiyonları, tamamı bildirilmemesine karşın 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde CİGH içinde en sık rastlanan etkidir. Halen Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 4 milyon yeni klamidyal infeksiyon olgusu geliştiği ve yıllık 2.4 milyar dolarlık bir maddi yüke neden olduğu bildirilmiştir. Dünya üzerinde her yıl yaklaşık 50 milyondan fazla yeni *C.trachomatis* infeksiyonu oluştuğu varsayılmaktadır. CİGH içinde yer alan *C.trachomatis* infeksiyonluların, HIV ile infeksiyon bakımından da yüksek riskli grup oldukları bilinmekte olup bu olgulardaki *C.trachomatis* infeksiyonun etkin sağaltımı, HIV infeksiyonun ilerleme hızının geciktirilmesi bakımından önemlidir (13).

C.trachomatis'in etkin olduğu temel organ kadın genital kanalı olmasına karşın bu etken erkek ve çocuklarda da infeksiyon oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri'nde *C.trachomatis*'in cinsel bakımdan aktif yaş grubundaki kadın popülasyonunda görülme sıklığı genellikle %10 dolayında iken CİGH kliniğine başvuran kadınlarda bu oran %40'ın üzerine çıkmaktadır. Asemptomatik erkeklerde ise *C.trachomatis* oranı %4-10 arasında iken CİGH kliniğine başvuran erkek hastalarda bu oran %15-20'ye çıkmaktadır. Yeni doğanda görülen klamidya infeksiyonları ise perinatal bulaş sonucunda oluşur. *C.trachomatis* ile infekte annelerin yaklaşık %65'inin bebeklerinin vaginal kanaldan geçiş sırasında infekte oldukları bildirilmiştir. *C.trachomatis* ile infekte erkeklerin %50'si, kadınların ise %70-80'i bulgusuzdur. Bu sonuçlar büyük bir bilinmeyen taşıyıcı popülasyonun varlığını gösterir ki bu popülasyon cinsel partnerlerine infeksiyonu aktarırlar ve yineleyen infeksiyon sıktır. Tekrarlayan infeksiyonlar ektopik gebelik, infertilite gibi sekellerin oluşma riskini artırır (13,14).

Türkiye'de *C.trachomatis* infeksiyonlarının epidemiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte özellikle ürogenital *C.trachomatis* infeksiyonları konusunda yapılan bazı çalışmalar ülkemizdeki genel duruma ışık

tutmaktadır. Örneğin İzmir'de yapılan çeşitli çalışmalarda *C.trachomatis* insidansı bulgusuz kadınlarda %23-27.3, yakınmalı kadınlarda %32.4-42, İnfertil kadınlarda %8.5-11.5, genelevde çalışan kadınlarda ise %25.4 olarak bildirilmiştir. Aynı bölgede etkeni *C.trachomatis* olarak bildirilen konjunktivit olgularının insidansı ise %26.5'tir (15-19). İstanbul'da yapılan bazı çalışmalarda gebe kadınlarda %1.1, hayat kadınlarında %22, hayat kadınları ile ilişki kuran erkeklerde %14.7 oranında *C.trachomatis* enfeksiyonu saptanmıştır (20,21).

Türkiyede *C.trachomatis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi konusunda önemli bir boşluk vardır, bu konuda yapılacak çalışmalar toplumumuzda enfeksiyonun oluşturabileceği riskleri azaltacaktır.

4.2.2 *C.trachomatis* enfeksiyonlarının demografik faktörlerle ilişkisi

Dünyada *C.trachomatis* enfeksiyonları ile bağıntılı en önemli demografik faktör, yaş olarak bildirilmiştir. Özellikle genç kadınlar (<20 yaş) enfeksiyon bakımından risk grubudurlar. Yaş ile enfeksiyon arasındaki bu ilişkinin biyolojik nedeni genç kadınların servikslerindeki anatomik farklardan kaynaklanmaktadır. Skuamo-kolumnar birleşme bölgesinin 20 yaş altı grupta dış servikal deliğe daha yakın (Ektopi) olması, *C.trachomatis*'in enfeksiyondaki hedefi olan kolumnar epitele daha kolay ve çok sayıda ulaşmasına neden olmaktadır (14).

Daha ileri yaş grubundaki kadınlarda enfeksiyonla ilişkili diğer demografik faktörler devreye girmektedir. Özellikle evli olmayan kadınlar, nulliparite, siyah ırk ve düşük sosyoekonomik durum, Amerika Birleşik Devletleri'nde riski arttıran demografik faktörler arasında bildirilmiştir. Çok sayıda cinsel eş, yeni bir cinsel eş, bariyer kontraseptif araçların kullanılmaması ve gonokokkal enfeksiyon varlığı *C.trachomatis* enfeksiyonları ile yakından ilişkili faktörlerdir.

Oral kontraseptif kullanımının da *C.trachomatis* ile ilişkili olduğu düşünölmekle birlikte, PID ile ilişkisi yoktur, oral kontraseptif kullanımının ektopiye yol açtığı inancı, bu durumun nedeni olarak öne sürölmektedir (41).

Yukarıda bildirilen demografik faktörler, dünya üzerinde halen *C.trachomatis* infeksiyonlarına maruz kalan kadınlarda, önde gelen risk faktörleri olarak görölmekle birlikte, farklı davranış gösteren toplumlarda ve zaman içinde genel davranış modelindeki değışiklikler ile değışebileceği düşünölmektedir.

Türkiyede toplum içinde riski arttıran faktörler ve infeksiyon ile ilişkilerini gösteren özel bir çalışma henüz yoktur. Dünyada geçerli risk faktörleri, Türkiye için de kabul edilebilmekle birlikte, topluma özgü davranış modeli farklılıklarından kaynaklanan değışik risk grupları ve başka toplumlarda kabul edilmiş risk gruplarında farklılıklarla karşılaşılabılır.

4.3 Klinik

C. trachomatis yalnızca insanda patojendir ve en sık cinsel ilişki ile geçen, bakteriyel ajandır. Bu türün A, B, Ba, C serotipleri, sıklıkla önlenebilen körlük nedeni olan endemik trahomdan sorumludurlar. L1, L2, L3, serotipleri Lenfogradüloza venerum (LGV) ile ilişkilidir. *C.trachomatis*'in D-K arasındaki serotipleri ise LGV dışındaki diğer cinsel geçişli infeksiyon tablolarının sorumlusudur. Erkeklerde; Üretrit, epididimit ve Reiter sendromu, kadınlarda; Servisit, üretrit, endometrit ve salpenjit oluşturur. Salpenjit, tubal yapışıklık, infertilite ve ektopik gebeliğe neden olabilir. Gebe kadının serviksinde taşınan etkenin doğum kanalından yenidoğana bulaşımı, yenidoğanın inklüzyonlu konjunktivitine ve/veya yenidoğan pnömonisi ile sonuçlanır. Bu etken yenidoğanın faringeal, vajinal ve enterik infeksiyonlarında da akla gelmelidir (1, 42).

Kadınlarda, klinik olarak *C.trachomatis*'in ön tanısının konması erkeklere göre daha zor, olası komplikasyonları bakımından da daha önemlidir. Vajinal akıntı, kanama, alt abdominal ağrı, disüri, *C.trachomatis* infeksiyonlarında sıklıkla görülen ancak özgül olmayan bulgulardır. Birçok kadında, sözü geçen bulgular oluşmadan *C.trachomatis* genital infeksiyonu haftalarca hatta aylarca bulgusuz olarak sürebilir. Gonokok infeksiyonlarında olduğu gibi, *C.trachomatis* infeksiyonlarında da kadınlarda en sık serviks (infekte kadınların %75'i), Üretra (infekte kadınların %50'si) ve rektum (infekte kadınların %25'i) tutulur. Olguların %30-%50 sinde gonokok ve *C.trachomatis* infeksiyonu eş zamanlı olarak görülür, bu nedenle gonokok tanısı alan kadınlarda *C.trachomatis* infeksiyonu ve sekel riski akla getirilmelidir (43).

C.trachomatis'e bağlı servistte tipik olarak, serviksten yeşil-sarı renkli mukopürülan akıntı, servikal ektopi, ektopi alanında ödem, kolayca veya kendiliğinden kanayabilen servikal mukoza görülür. Mukopürülan sekresyondan alınan sürüntü örneğinden yapılan gram boyasında yüksek büyütmede (x 1000) her alanda 10'dan fazla polimorfonükleer lökosit (PNL) görülmesi *C.trachomatis*'i düşündürmelidir (43,44).

C.trachomatis'in etken olduğu üretral infeksiyonlar bulgusuzdur. Bazı kadınlarda ivergen üretrit tablosu *Escherichia coli*'ye ait üriner sistem infeksiyonlarına öykünebilir. Bu olgularda disüri, pyüri, bulunmasına karşın rutin idrar kültürlerinde üreme olmaması dikkat çekici olmalıdır (45,46).

Serviksteki *C.trachomatis* infeksiyonları asendan yolla endometriyum ve fallop tüplerine yayılabilir. *C.trachomatis* ile infekte servisiti olan kadınların üçte birinden fazlasında histolojik olarak endometrit gösterilmesine karşın üst genital yollarla ilgili hiçbir klinik bulguya rastlanmamıştır yine de bazı klinik gözlem ve jinekolojik bulguları ile endometrit tanınabilir. Vajinal kanama öyküsü, mukopürülan servisitle birlikte alt abdominal ağrı, bimanuel pelvik

bakıda adnekslerde duyarlılık olmaksızın uterusda duyarlılık bulunması *C.trachomatis* endometriti için kanıt olabilir (47).

C.trachomatis'in etken olduğu pelvik inflamatuvar hastalık (PID), *N.gonorrhoeae*'nin etken olduğu PID'ta olduğu gibi yüksek ateş, lökositoz ve diğer klinik bulguları göstermediğinden tanısı zordur, ancak klinisyenin pelvik bakı sırasında mukopürülan servisitli hastada, servikal, uterin, adneksiyal, duyarlılık bulması klamidiya infeksiyonunu düşündürmelidir (48).

Klamidyal infeksiyon bazen fallop tüplerinden karaciğer kapsülüne yayılarak "Fitz-hugh Curtis sendromu" olarak adlandırılan perihepatit oluşturur. Genç, cinsel aktif kadınlarda, sağ üst kadranda ağrı, bulantı, kusma, ateş görülmesi bu tanıyı düşündürmelidir. Son çalışmalarda bütün perihepatitli olguların *C.trachomatis*'le ilişkili olduğu bildirilmiştir. PID'nin klinik bulguları olsun ya da olmasın Fitz-Hugh Curtis sendromu görülebilir (49-50).

4.4. Laboratuvar Tanı

C.trachomatis'in laboratuvar tanısında geleneksel yaklaşım ürogenital bölgeden toplanan ve hazırlanan örneklerin özel hücre kültürlerine inoküle edilerek üretilmesidir. 1980 li yılların sonundan bu yana çeşitli antijen ve nükleik asit saptama yöntemleri geliştirilerek *C.trachomatis* tanısında, daha ucuz, hızlı, duyarlı, özgül yöntemlerle tanıya gidilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. *C.trachomatis*'in laboratuvar tanısına günümüz yaklaşımı karmaşık ve tartışmalıdır. Yapılan taramalarda, farklı teknolojilerdeki yöntemlerin kullanılmasıyla tanı ve doğrulamaya gidilmesi en geçerli hatta zorunlu yaklaşımı oluşturmaktadır. Özellikle düşük prevalanslı topluluklarda yapılan incelemelerde, uygulanan tekniğin pozitif prediktif değeri ve alınan örneğin kalitesi, sonucu etkileyen en önemli faktörlerdir. Bu nedenle *C.trachomatis* tanısına giden yolda en önemli basamaklar; Geçerli bir altın

standart saptanması ve elde edilen sonuçların bu teknikle doğrulanması ile kullanılan tekniklere uygun, doğru örneklerin alınmasıdır. Yapılan çalışmalarda, örneklerin doğru, yeterli toplanmasının ve uygun ortamlarda taşınmasının, tanı testlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü doğrudan etkilediğini bildirmiştir (51,52).

4.4.1. İzolasyon

C. trachomatis'in tanısında altın standart etkenin üretilmesidir. Zorunlu hücre içi paraziti olan bu bakterinin üretilmesinde, viruslarda kullanılan benzer bir hücre kültür yöntemi kullanılır.

Örnek Toplanması ve Taşınması :

C.trachomatis'in izolasyonunda başarı sağlanması için ilk ve en önemli aşama, uygun örneklerin, doğru biçimde alınmasıdır. Kadınlarda en sık kullanılan araç ve örnek, silgeç ya da hücre fırçaları (cytobrush) ile alınan endoservikal ve/veya üretral sürüntü örnekleridir. Örnek alımı sırasında kullanılan silgeçler önemlidir, bunun nedeni silgeçlerin hücre kültürlerine olan toksik etkileri ve hücre kültüründe üremesi olası klamidyalı inhibe etmeleridir. *C.trachomatis* hücre kültürü için kullanılabilecek uygun silgeçler; dakron, rayon, pamuk ve kalsiyum alginat başlıklı olanlardır. Bunların, hücre kültürlerine toksik etkileri olmadığı saptanmıştır. Silgeçlerin seçiminde özen gösterilmesi gereken diğer bir özellik ise saplarının ağaç veya ağaç ürünlerinden yapılmamış olmasıdır. İdeal bir hücre kültürü örneği, plastik veya alüminyum saplı ve dakron, rayon, pamuk yada kalsiyum alginat uçlu bir silgeçle alınmalıdır (53,54).

Endoservikal bölgeden örnek alınmadan önce servikal girişin dış kısmında bulunan akıntı ve sekresyonlar steril bir silgeç veya gazlı bezle temizlenir ve

atılır. Bunun nedeni içerindeki maddelerin hücre kültürü üzerine olası toksik etkilerinin ve bakteriyel kontaminasyonun engellenmesidir. Sonra bir başka silgeç servikal girişten 1-2 cm içeriye sokularak skuamokolumnar birleşme bölgesi geçilir ve *C.trachomatis* infeksiyonuna duyarlı olan kolumnar epitel bölgesine gelinerek 10-30 saniye süre ile döndürülerek örnek alınır. Vajinal mukozaya değmemeye özen gösterilerek silgeç geri çekilir. Endoservikal örnek alınmasında kullanılan diğeri araç ise hücre fırçasıdır (cytobrush). Bunlar, silgelere göre daha fazla hücre toplayabilmekte, dolayısı ile hücre kültürünün duyarlılığını arttırmaktadır. Hücre fırçalarının, silgelere göre direk floresan antikor (DFA), ve hücre kültürü tekniklerinde duyarlılığı arttırdığı bulunmuştur. Ancak bunlar, örnek alımı sırasında kanamayı kolaylaştırdığı için kanın inhibitör etki yaptığı bazı non-kültürel testlerde ve gebe kadınlarda kullanışlı değildir (13,54-56).

Kadınlarda, servikal sürüntülerle birlikte, üretral sürüntü örneklerinde aynı anda alınarak, birlikte işlemlenmesinin kültür duyarlılığını %23 arttırdığı bildirilmiştir (45). Üretral sürüntü alınmadan önceki en az bir saatlik süre içinde hasta idrar yapmamalıdır. Üretral örneklerin alımında, yapılan ön temizlikten sonra silgeç üretra ağzından 1cm içeri sokularak döndürülür ve servikal örnekle birlikte veya ayrı ayrı, taşıma besiyerine konur (13,53-56).

Erkeklerde *C.trachomatis* hücre kültürü için tercih edilen örnek, silgeç ile distal üretradan alınır. Kuru bir silgeç son bir saat içinde idrar yapmamış hastanın üretrasından içeri üç, dört santimetre sokularak döndürülür, çıkarılır ve hemen taşıma ortamına alınır.

Konjunktival örnek alımı için endoservikal örneklerde olduğu gibi pürülan eksüda önceden temizlenmelidir. Epiteliyal hücreler kuru bir silgele palpebral konjunktivadan toplanırlar.

Lenfogradüloza venerum düşünölen olgularda, bubolardan yapılan aspiratlar, alt gastrointestinal sistemden anoskopi yardımı ile alınan rektal sürüntü veya biyopsiler en iyi örneklerdir. Gastrointestinal kanaldan alınan örnek için en uygun bölgeler hipertrofik veya ülsere lezyonlardır.

Toplanan klinik materyaller derhal taşıma ortamına alınmalı ve laboratuvara ulaştırılıncaya kadar +2 - +8 c°de saklanmalıdır. Klinikte alınan materyaller en geç 48 saat içinde kültüre alınmalıdır. Eğer bu mümkün değilse taşıma ortamı içindeki örnekler -70c°de dondurularak saklanır, ancak bu örneklerdeki elementer cisimlerde %20 oranında canlılık kaybı olabileceği bildirilmiştir.

Klamidyalar için çeşitli taşıma ortamları geliştirilmiştir. En çok kullanılanı 2-Sükroz fosfat (2-SP) veya sükroz glutamat fosfattır (13). Dondurulmak üzere saklanan taşıma ortamlarına %2-5 oranında fetal bovin serum (FBS) eklenmesinin klamidyaların canlılığının korunmasına yardımcı olabileceği bildirilmiştir. Taşıma ortamlarına bakteriyel ve fungal kontaminantların üremesini engellemek için gerekli antimikrobiyal ve antifungal ajanlar eklenmelidir. Bu ajanların klamidyaların üremesini engellememesi önemlidir. Bu nedenle tetrasiklin, penisilin, makrolidler gibi geniş spektrumlu antibakteriyeller kullanılmamalıdır. Virusların izolasyonunda kullanılan taşıma ortamları da klamidyalar için uygun değildir, çünkü bunlarda genellikle antibakteriyel olarak penisilin kullanılır. Klamidyal taşıma ortamlarına bakteriyel kontaminasyonu engellemek üzere Gentamisin (10µg/ml) ve Vankomisin (100µg/ml), fungal kontaminasyonu engellemek için ise Amfoterisin B (2,5 - 4,0 µg/ml) veya Nistatin (25 - 50u/ml) kullanılır. Son zamanlarda kültür ve bazı nonkültürel klamidyal testlerde kullanılmak üzere hazır sentetik taşıma ortamları geliştirilmiştir [M₄ transport Media (Micro Test Inc.), Flex Trans Media (Bartels Diagnostics)] (13,56-58).

Kültür yöntemi :

Hücre kültürü, *Chlamydia trachomatis*'in ürogenital örneklerde aranmasında, yakın zamana kadar tek altın standart olarak benimsenmiştir. Bunun nedeni özgülüğünün % 100 olmasıdır. Kültür sadece canlı infeksiyöz klamidyal elementer cisimleri gösterir ve kontaminasyon riski minimaldir. Kültürün altın standart olarak kullanımındaki sorunlar ise DNA amplifikasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında duyarlılığının görece az olması, klinik örneklerin taşınmasında kesinlikle soğuk zincire uyulmasına gereksinmesi, 3-7 gün gibi uzun bir sürede sonuç vermesi sayılabilir. Kültürün en önemli avantajı ise organizmayı canlı koruyarak serotiplendirme, genotiplendirme, antibiyotik duyarlılık testleri gibi çalışmaların yapılabilirliğini sağlamasıdır (59,60). Servikal, üretral, nazofaringeal, rektal ve puberte öncesi çağıdaki kızlarda vajinal örneklerde *C.trachomatis* hücre kültürü uygulanması önerilmektedir.

C.trachomatis kültürü, alınan klinik örnekler hücre serilerine inoküle edilerek uygulanmaktadır. Yeterli sayıda canlı *C.trachomatis* elementer cisimleri hücreleri infekte ederek intrasitoplazmik inklüzyon cisimleri meydana getirir. *C.trachomatis* hücre kültürleri için gerekli hücre serileri, genellikle "Shell vial" içinde, tabanında oturmuş uygun lameller bulunan şişeciklerde, ya da çok çukurlu mikrokültür plaklarında üretilir. Bu kültürlerde en sık *Mc Coy* veya *HeLa 229* hücre serileri yeğlenir. Son yapılan çalışmalarda *Buffalo Green Monkey böbrek* (BGMK) hücrelerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir. Klinik örneklerden, shell vial tekniği kullanılarak yapılan kültürlerin, mikropalak yöntemine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni shell vial tekniğinde mikropalak tekniğine göre daha fazla klinik örnek inoküle edilebilmesidir. Ayrıca shell vial tekniğinde, inokülasyon yapılacak olan hücre serisine klinik örneğin eklenmesinden sonraki santrifüj işlemi çok daha yüksek devirlerde yapılabilmektedir ve hücre serilerine daha fazla elementer cisim

geçmektedir. Mikroplak yönteminde çukurdan çukura geçişteki kontaminasyon riski de yüksektir. Mikroplak yönteminin en önemli avantajı birim test maliyetinin shell vial göre daha düşük olması ve uygulama kolaylığıdır.

İnokülasyondan 48-72 saat sonra oluşan inklüzyonlar, floresan boya ile işaretli klamidyal LPS'ye ya da *C.trachomatis*'e özgül MOMP'a tutunan antikorlarla boyanarak görüntülenirler. LPS antikorları, bütün Klamidyal türlere ait LPS'lere tutunurken, MOMP'a ait antikorlar türe özgüdür. Inklüzyonların görüntülenmesi, morfolojik bakımdan çok tipik olmaları nedeni ile kültür testlerinin %100 özgül olmasını sağlamaktadır.

Gram, Giemsa, İyodin gibi boyalar da hücre kültürlerindeki inklüzyonların görüntülenmesinde kullanılabilir ancak bu boyaların kullanımının floresan antikorla boyama tekniğine göre testin duyarlılığını düşürdüğü bildirilmiştir. Klamidyalar her ne kadar gram olumsuz bakteriler olarak tanımlanıyorsa da bu boya klamidyaların değişken boyanmaları nedeniyle pratik değildir. Giemsa ile boyamada klamidyalar diğer mikroorganizmalardan renk, morfoloji, inklüzyonun hücre içindeki lokalizasyonu gibi özelliklerle ayırt edilebilir. Ancak bu ayrımın yapılabilmesinde uzmanlaşmış bir göze gerek vardır. Ayrıca inklüzyonlar, boyamadan kaynaklanan kalıntılarla kolaylıkla karışabilir. İyodin ise glikojene seçici bir boyadır. Sadece *C.trachomatis* bu boya ile boyanabilir, ancak, servikal kolumnar epitel hücrelerinin de yüksek düzeyde glikojen içermesi nedeniyle, özellikle endoservikal örneklerin boyanmasında iyot kullanılması hatalara yol açabilir (61- 66).

4.4.2. İnfekte dokulardan alınan örneğin sitolojik incelemesi

C.trachomatis ile infekte doku örneği, doku kazıntısı veya sürüntüsü olarak alınarak infeksiyonun karakteristik bulgusu olan intrasitoplazmik inklüzyonlar aranır. Bunun için infeksiyonun yerine göre endoservikal, konjunktival ya da başka epitelial hücreler incelenir.

Alınan örnek Giemsa, floresan ile işaretli antikor ya da iyodin boyası (glikojen içeren inklüzyonlar için) ile boyanır. Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü laboratuvarlara göre değişir, ancak tecrübeli ellerde giemsa ve floresan antikor tekniğinin duyarlılık ve özgüllüğünün aynı olduğu bildirilmektedir. Giemsa boyası inflamatuvar yanıtın da gösterilebilmesi için önem taşır. Bu özellik *C.trachomatis* ile oluşan oküler infeksiyonlarda önemlidir ancak serviks veya üretradan alınan örneklerde böyle bir avantaj söz konusu değildir (67).

4.4.3. Antijen aranması

C.trachomatis antijenlerinin, kültür dışı yöntemlerle gösterilmesini sağlayan ticari kitler bulunmaktadır. Antijen arama tekniklerinde kullanılan antikorlar, MOMP veya LPS antijenlerini tanımaktadırlar. Bunlardan biri, DFA tekniğidir. Bu tekniğin temeli hastalardan alınan klinik örneklerden hazırlanan preparatların florosein izotiyosiyanat ile işaretlenmiş *C.trachomatis* monoklonal antikorları ile karşılaştırılarak örnekte bulunan antijenlerin saptanmasıdır (68). Kullanılan diğer bir antijen arama tekniği ise EIA'dır (69). EIA, DFA gibi tecrübeli bir göze ve immün floresan mikroskobu gibi ek donanımına gerek göstermez. Antijen antikor reaksiyonları spektrofotometrede okutularak saptandığından DFA'a göre daha nesneldir.

Ayrıca son yıllarda, hızlı testler ya da hasta başı testleri adı verilen, çıplak gözle değerlendirilebilen, EIA tekniğinde çalışan ticari kitler ortaya çıkmıştır. Hızlı testler genellikle doktorların ofislerinde ya da az klinik örnek gelen küçük laboratuvarlarda kullanılmak üzere hazırlanmışlardır. Gelişmiş donanıma gereksinmez, yaklaşık 30 dakika içinde sonuç verir, tek tek çalışılabilir ve sonuçları genellikle çıplak gözle okunur. Hızlı testlerde de laboratuvarlarda kullanılan klasik EIA lar gibi cinse özgül anti-LPS antikoları kullanılırlar (Genellikle fare IgG). Anti-LPS antikolarının kullanılması nedeniyle bu antikoların MOMP a göre daha kolay elde edilmesi ve daha çözünür olmasıdır fakat bu antikoların, türe değil cinse özgül olmaları, diğer mikroorganizmaların (Gram negatif enterik basiller, Neisseria'lar vb.) LPS antijenleri ile çapraz reaksiyon vermesi gibi önemli zayıflıkları vardır. Çapraz reaksiyonlar nedeniyle oluşabilen yanlış olumluluklar hızlı testlerin düşük riskli hasta gruplarında, bulgusuz hastalarda tarama amaçlı kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır (14,70).

Optik immunoassay adı verilen bir hızlı teknik ile ince bir film yüzeyinde oluşan antijen antikor etkileşimi antikoru tanıyan konjugat aracılığı ile gözle görülebilir hale getirilmektedir (70).

4.4.4. Seroloji

Kompleman birleşme deneyi klamidiyal antikoların gösterildiği ilk serolojik yöntemdir. Kompleman birleşmesinde kullanılan antijen, embriyonlu yumurtanın sarı kesesinde üretilen *C.trachomatis*' in kaynatılması ve fenolle karşılaştırılması ile elde edilir. Bu test psittakoz ve LGV için sıklıkla kullanılmakla birlikte oküler ve genital infeksiyonlar için duyarsızdır. Daha sonra İndirek mikroimmunofloresan (MIF) yöntemi geliştirilmiştir (10). MIF kompleman fiksasyon deneyine göre daha duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Bu yöntemle IgA, IgM, IgG antikoları ölçülebilmektedir. Ancak geçirilmiş

infeksiyonlara bağlı serokonversiyon bu yöntemin tanıda kullanılabilirliğini sınırlamaktadır. Bu antikolar kültür olumsuz hastalarda da bulunabilmektedir. Serolojik testler, epidemiyolojik değerlendirmelerde, özellikle popülasyondaki klamidyaya ile karşılaşma oranının saptanmasını amaçlayan genel taramalarda kullanılışlıdır (67).

Deri testi aşırı duyarlılığı (Frei testi), duyarlılığı ve özgülüğü yüksek tanısal testlerin olmadığı, uzun bir zaman sürecinde *C.trachomatis*'in oluşturduğu LGV tanısında kullanılmıştır. Ancak Frei testi diğer klamidyalarla oluşan infeksiyonlarda da olumlu sonuç verdiğinden günümüzde kullanılmamaktadır (67).

4.4.5. Moleküler yöntemler

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR), ligaz zincir tepkimesi (LCR), DNA probları gibi yöntemler *C.trachomatis* tanısında gündeme gelmişlerdir. Özellikle PCR, duyarlılığının yüksekliği ile klamidyaya tanısında yeni bir altın standart olmaya adaydır.

4.5. Sağaltım

Tetrasiklinler, *C.trachomatis* infeksiyonlarında genellikle ilk tercih edilen etkin antibiyotiklerdir. Tetrasiklinin kontrendike olduğu hamile kadınlar, infantlar, küçük çocuklar vb. durumlarda eritromisin önerilmektedir. *C.trachomatis* infeksiyonlarında son yıllarda azitromisinin de etkili olduğu bildirilmiştir (71). Erişkin ve adolesanlarda komplike olmamış genital *C.trachomatis* infeksiyonlarının tedavisinde 7 gün süreyle oral yol ile günde iki kez 100 mg doksisisiklin veya 1g azitromisin önerilmektedir (72-74).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Olgu seçimi ve örnek alınması

a. Olgu seçimi:

Örnekler, Ocak 1998- Nisan 1998 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları polikliniğine çeşitli yakınmalarla başvuran ve spekulum bakısında, servisle ilgili yakınması olsun ya da olmasın ıvegen ya da süregen servisit tanısı alan hastalardan alındı.

Toplam 86 hastadan örnek alındı. Toplam 11 hasta örneği; 6'sı hücre kültürü ve EIA için deneyi etkileyebilecek kadar hemorajik olması, 5'i ise DFA lamalarında değerlendirme yapılabilecek yeterli sayıda hücre bulunmaması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya alınan 75 hastanın yaşları 21 - 51 arasında (ortalama 35) idi. Her hasta için, örneğin alındığı tarih, hastanın yaşı, mesleği, adresi, şikayeti, klinik bulguları, kullandığı antibiyotikler gibi bilgileri içeren hasta formları dolduruldu (Ek 1).

b. Örnek alımı:

Her hastadan DFA, EIA ve hücre kültürü için olmak üzere üç ayrı endoservikal sürüntü örneği alındı. DFA ve EIA deneyleri için alüminyum saplı, steril, dakron uçlu silgeçler (CHLAMYSET® Orion) kullanılırken, hücre kültürü için plastik saplı steril hücre fırçaları (CLAMYSET® ORIBRUSH™) kullanıldı. Örnekler her hasta için DFA, EIA, hücre kültürü sırası ile toplandı.

Örnek alımı, spekulum ile yapılan fizik bakıyı izleyerek, steril bir kuru pet ile dış servikal girişteki mukus ve akıntı temizlendikten sonra yapıldı. Silgeçler ve cytobrush, kolumnar epitel seviyesine dek ilerletilerek birkaç kez rotasyon hareketi yapıldı. Bu şekilde alınan örneklerden birincisi DFA incelemesi için özel lamlara (CHLAMYSET®Antigen microscopic slides) sürülerek havada kurumaya bırakıldı. EIA için alınan ikinci sürüntü örneği, hemen hasta başında bir optik immunoassay (OIA) olan CHLAMYFAST® OIA® ile işleme alındı. Hücre kültürü için alınan üçüncü örnek ise derhal 2-SP klamidiyal taşıma ortamına alındı. Hücre kültürü için alınan örneklerden iki saat içinde işlemlenemeyenler +4C°'ye kaldırıldı. Bütün hücre kültürü örnekleri en geç 8 saat içinde işlemlenerek uygun besiyerine ekimi yapıldı.

5.2. DFA ile antijen aranması

DFA tekniği için, florosein-izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş *C.trachomatis*'in MOMP antijenine özgül monoklonal antikorları içeren ticari kit CHLAMYSET® ANTIGEN FA (Orion Diagnostica) kullanıldı. İşlemler üretici firmanın önerilerine uygun olarak yapıldı. Tüm çalışma serilerinde aynı firmaya ait olumlu ve olumsuz kontrol lamları kullanılarak test kalite güvencesi sağlandı.

5.2.1. Kit İçeriği :

- FITC ile işaretli liyofilize monoklonal antikor
- Liyofilize antikor çözücü solvent (fosfat tamponu)
- Kaplama çözeltisi

5.2.2. Araç ve Gereçler :

- Otomatik pipetler ve Steril pipet uçları
- Lameller
- Cam şale

- Dakron silgeçler (CHLAMYSET® Orion)
- Özel lamalar (CHLAMYSET® ANTIGEN microscobic slides- Orion)
- Petri kapları
- Floresan mikroskobu (NİKON)

5.2.3. Yöntem :

• Özel lamlara, sürülerek aktarılan endoservikal epitel hücreleri havada kurutulduktan sonra metanolle fikse edildi. Hemen işleme alınmayacak olan örnekler önerilen yönteme uygun olarak -20C°de saklandı.

• +4 C°de saklanan kit oda ısısına getirildikten sonra liyofilize monoklonal antikor, solvent içinde çözündürülerek kullanıma hazır duruma getirildi.

• Hazırlanan monoklonal antikordan 30µl alınarak fikse edilmiş örnek üzerine eklendi.

• Lamlar nemli ortam sağlamak üzere içinde ıslatılmış kağıt havlu bulunan petri kaplarında, oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.

• Inkübasyon sonunda lamlar içinde distile su bulunan şalede yıkanarak bağlanmayan antikorlar lamlardan uzaklaştırıldı ve lamlar kurumaya bırakıldı.

• Preparatların üzerine 20µl kaplama çözeltisi eklenerek lamel ile kapatıldı.

• Hazırlanan preparatlar eksitasyon dalga boyu ≤ 490 nm, emisyon dalga boyu ortalama 520 nm olan filtreler ile floresan mikroskobunda x400

büyütmede tarandıktan sonra pozitif bulunan lamalar x1000 büyütmede immersiyon yağı ile incelenerek doğrulandı.

- 10 veya daha fazla sayıda elma yeşili floresan veren düzgün kenarlı yuvarlak veya oval elemanlar cisim görülen preparatlar olumlu olarak değerlendirildi.

5.3. EIA ile antijen aranması :

EIA için, klamidiyal LPS antijenlerini tanıyan, konjugatla işaretlenen ve bir substratla görünürleştirilen, anti-LPS antikorlarının kullanıldığı ticari bir OIA® kiti CHLAMYFAST® OIA® (International Microbio) ile çalışıldı.

5.3.1. Kit İçeriği :

- Merkezine LPS antijeni ya da örnek eklenebilen ince silikon tabaka içeren plastik kutular.
- Reagent1A (Klamidiyal antijen ekstraksiyon reaktifi).
- Reagent1B (Klamidiyal antijen ekstraksiyon reaktifi).
- Reagent 2 (Nötralizasyon reaktifi).
- Reagent 3 (Konjugat).
- Reagent 4 (Yıkama solusyonu).
- Reagent 5 (Substrat-tetrametil benzidin).
- Pozitif kontrol (İnaktive klamidiyal LPS).
- Ekstraksiyon tüpleri ve damlalık kapakları.
- Taşıma pipetleri.

5.3.2. Araç ve Gereçler :

- Saat.
- Kontamine atık kabı.
- Dakron silgeçler (CHLAMYSET®Orion).
- Tüp taşıyıcı.

5.3.3 Yöntem :

• Örnekler işleme alınmadan 2 saat önce tüm reaktifler üretici firmanın önerdiği gibi oda ısısına getirildi ve kullanılmadan önce çalkalanarak homojenleştirildi.

- Alınan sürüntü örnekleri hasta başında hemen işleme alındı.

Alınan klinik örneklerden antijen ekstraksiyonu:

• Reagent1A'dan iki serbest damla ekstraksiyon tüpüne aktarıldı ve hasta örneğinin bulunduğu silgeç tüpün içine konarak karıştırıldı. İki-üç dakika beklendi.

• Silgeç kenara alınarak ekstraksiyon tüpüne 6 damla Reagent 1B eklendi ve sıvı silgeç yardımı ile yine karıştırıldı. İki-üç dakika beklendi.

• Ekstraksiyon tüpüne 6 damla Reagent 2 (Nötralizasyon reaktifi) eklendi ve karıştırıldı. Silgeç tüpün içinde iken esnek olan tüp sıkılarak silgecin içindeki sıvının tüpe akması sağlandı ve silgeç atıldı. Oluşan sarı - turuncu renkli sıvı ekstraksiyonun tamamlandığını gösteriyordu.

Antijen aranması:

- Test kitinde bulunan plastik reaksiyon kutusu açıldı ve yatay bir yüzeye konuldu.
- Antijenle kaplama; Ekstrakte edilmiş örnek temiz bir taşıma pipeti ile karıştırıldıktan sonra bir damla alınarak altın sarısı röfle veren antikor kaplı silikon tabakanın ortasına bırakıldı, 5-8 dakika beklendi.

- Konjugatla işaretleme; Bir damla Reagent 3 (Konjugat) silikon yüzeyin merkezinde bulunan ekstrakte edilmiş klinin örnek damlasının üzerine bırakıldı, 5-6 dakika beklendi.

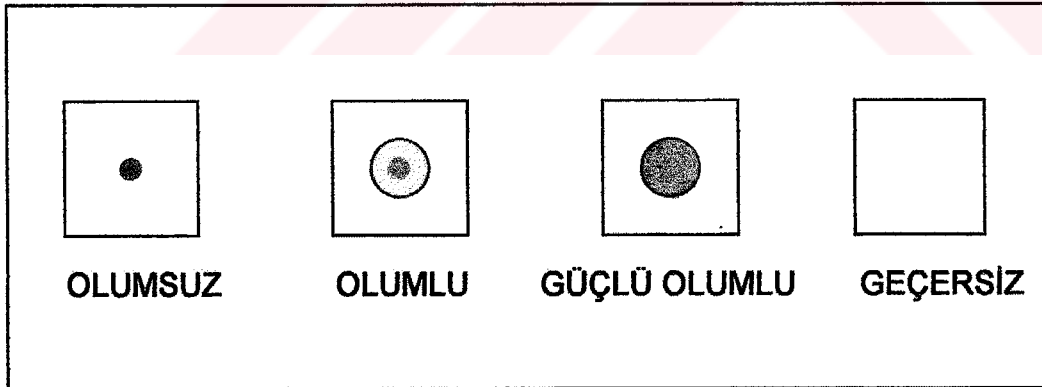
- 1.Yıkama; Silikon tabakanın yüzeyindeki Konjugatla karışık ekstrakte edilmiş örnek, Reagent4 (yıkama solusyonu) ile yıkanarak yüzeyden uzaklaştırıldı. İç yüzünde bir kurutucu bulunan plastik kapak kapatılarak 10 saniye kapalı tutuldu ve silikon tabaka yüzeydeki nem giderildi.

- Kapak açılarak işaretleyici (Blotter) 1-no'lu pozisyondan 2-no'lu pozisyona getirildi.

- Görünürleştirme; Bir damla Reagent 5 (Substrat) kurutulan silikon yüzeyin merkezine bırakıldı, 10-12 dakika beklendi.

- 2. Yıkama; Silikon tabakanın yüzeyindeki substrat Reagent 4 ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Plastik kapak 10 saniye kapalı tutularak yüzey kurutuldu.

- Sonuçların okunması ve değerlendirilmesi; Geçerli test için silikon yüzeyin merkezinde mavi-mor küçük bir leke arandı. Bu kontrol lekesinin etrafında daha geniş bir leke görüldüğünde bu sonuç olumlu olarak değerlendirildi.



ŞEKİL3- OIA Deneyinde Olası Sonuçlar ve Değerlendirilmeleri

5.4. Hücre kültürü ile *C.trachomatis* aranması ve doğrulanması

Çalışmamızdaki hücre kültürü uygulamalarında, bir sürekli hücre serisi olan McCoy hücreleri kullanıldı. Hücreler flasklarda ardışık pasajlarla üretilerek, shell vial olarak adlandırılan, içinde tabana oturan yuvarlak lamellerin bulunduğu şişeciklere aktarıldı. Klinik örneklerin inokülasyonu shell viallerin içinde gerçekleştirildi.

5.4.1. Araç, gereç ve ortamlar :

- Klamidiyal taşıma ortamı (CTM): 2-SP (0.2M sükröz, 0.02M fosfat);

K₂HPO₄ 2.01g

KH₂PO₄ 1.01g

Sükröz 68.46g

Son hacmi 1000ml olacak biçimde deiyonize su da çözüldükten sonra 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edildi. Eriyiğe aseptik kurallara uyularak; Gentamisin (50µg/ml), Vankomisin (100µg/ml), Amfoterisin B (25µg/ml) eklendi. Elde edilen ortam, sıkı kapaklı, steril plastik tüplere 2'şer ml olarak aktarıldı. Gerekliğinde çıkarılmak üzere -20 C°'de saklandı.

- Hücre Üretme Ortamı (Growth medium-GM):

Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (Sigma® / M0769) 1L

Isı ile inaktive edilmiş FBS (Sigma®/F3018) 100ml

L-Glutamin (Sigma®/G5763) 10ml

Oranlarında karıştırılarak elde edildi. Ortam +4 C°'de 50'şer ml olarak steril vidalı kapaklı polistiren tüplerde saklandı.

- Klamidiyal İzolasyon Ortamı:

EMEM (Sigma® / M0769) 500ml

Isı ile inaktive edilmiş FBS (Sigma®/F3018) 50ml

| | |
|------------------------------|-------|
| L-Glutamin (Sigma®/G5763) | 5ml |
| Sikloheksimid (Sigma®/C0934) | 2.5mg |
| Gentamisin (Sigma®/G1272) | 2.5ml |
| Glukoz | 30µM |

Olacak biçimde aseptik koşullara uyularak hazırlandı, 50'şer ml'lik steril vidalı kapaklı tüplerde eşit miktarlarda +4C°'de saklandı.

- Shell vialler
- Tripsin 10x
- 25 santimetrekarelik Hücre kültürü flaskları (polistiren)
- Steril Pipetler
- Laminar akımlı kabinet
- CO₂'li 37C°'lik etüv
- Santrifüj
- İverted ışık ve floresan mikroskobu
- -70C° Derin dondurucu

5.4.2. Hücre Kültürü Uygulaması :

McCoy Hücrelerinin seri pasajlanması, saklanması ve shell viallere aktarılması;

Sık bir biçimde tabanında bir tabaka oluşturan (Konfluent) McCoy hücrelerini içeren bir flask alındı. İverted ışık mikroskobunda hücrelerin sağlıklı olup olmadığı kontrol edildi. Flaskın içindeki ortam boşaltıldı ve tabandaki hücreler 5 ml PBS ile yıkandı ve PBS aspire edilerek boşaltıldı. Flaska 1 ml %0.025'lik tripsin konuldu ve flask 10 saniye hafifçe sallanarak hücrelere tripsinin etki etmesi sağlandı. Bu tripsin boşaltıldı ve böylece tabana

iyi tutunamamış sağlıklı hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı. Flaska yeniden 1ml %0.025'lik tripsin kondu ve 37C°de 3 dakika inkübe edildi. Bu sürenin sonunda flask etüvden çıkarıldı ve yandan hafifçe vurularak tabandaki hücrelerin ayrılması sağlandı. Ortama 2 ml üretme ortamı konularak tripsinin hücreleri yıkıcı etkisi nötralize edildi. Flaskın içindeki hücreler pipet yardımı ile birkaç kez çekilip bırakılarak topak halde olan hücrelerin ayrılmaları sağlandı. Elde edilen hücrelerin bulunduğu ortamdaki 300 µl alınarak (Yaklaşık olarak 500.000 hücreye karşılık gelir) içinde 6 ml üretme ortamı bulunan 25 santimetrekarelik flaska alındı. Flaskın kapağı hafifçe gevşetilerek %5 CO₂'li 37 C°etüve kaldırıldı. İçinde ayrılmış hücrelerin bulunduğu kalan ortam, içinde 2 ml üretme ortamı bulunan steril shell viallere 20 şer µl olarak aktarıldı. Shell vialler de %5 CO₂ li 37C° etüve kaldırıldı. 48 Saat sonra flasktaki ve shell vialdeki sıkı bir tabaka oluşturan hücreler kullanıldı.

Toplanan hasta örneklerinin inokülasyona hazırlanması

Poliklinikte hücre fırçası ile alınan servikal sürüntü örnekleri bekletmeden CTM içine alınarak en kısa zamanda laboratuvara ulaştırıldı. İşleme alınması 4 saati geçen örnekler +4 C°de saklandılar ve tüm örnekler alındıktan en geç 8 saat sonra işlemlendiler. Toplanan örnekler laboratuvarda 2500 devirde vorteks ile karıştırılarak içindeki hücrelerin parçalanması sağlandı böylelikle ortamda olası serbest elementer cisimlerin artması sağlandı.

Inokulasyon ve Inkübasyon

Etüve kaldırılmış shell viallerden inverted ışık mikroskopunda hücrelerin inokülasyona uygun olup olmadığı kontrol edildikten sonra, ekilecek örnek başına 2 adet alınıp, içlerindeki üretme ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı. Vorteksle karıştırılmış CTM içindeki örnekten vial başına 0.2 ml alınarak shell viallere aktarıldı. Kalan CTM +4 C°de saklandı. Shell vialler oda ısısında 3000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek varlığı olası elementer cisimlerin hücrelerin

yüzeyine gömülmeleri sağlandı. Shell viallerin içindeki ortam aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine, 0.5µg/ml sikloheksimid içeren izolasyon ortamı eklendi. İzolasyon ortamı eklenen shell vialler %5 CO₂'li 37C° etüve kaldırıldı ve 48 saat inkübe edildi.

Değerlendirme

İnkübasyon sonunda shell vialler önce inverted ışık mikroskopunda incelenerek kontaminasyon ve toksisite bakımından sağlıklı olup olmadıkları incelendi. Gerekli durumlarda +4C° de saklanan yedeklerinden yeniden inokülasyon yapıldı.

İncelenecek olan vialdeki izolasyon ortamı boşaltıldı. Hücreler 1ml PBS ile yıkandıktan sonra metanol eklenerek 10 dakika süreyle fikse edildi, sonra metanol aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı.

Bu biçimde floresan boyamaya hazır duruma gelen hücrelerin üzerine 30µl FITC ile işaretlenmiş *C.trachomatis*'in MOMP antijenine özgü monoklonal antikor eklendi. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Sonra reaktif ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreler birkaç kez PBS ile yıkandı. Shell viallerin dibindeki lameller bir forseps yardımı ile çıkarılarak önceden üzerine kaplama eriyiği damlatılmış lamaların üzerine kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar eksitasyon dalga boyu $\leq 490\text{nm}$, emisyon dalga boyu ortalama 520nm olan filtreler ile floresan mikroskopunda x400 büyütmede tarandıktan sonra pozitif bulunan lamalar x1000 büyütmede immersiyon yağı ile incelenerek doğrulandı. Olumlu bulunan örneklerin ikinci Shell viallerinde inkübe olan hücreler, daha önce belirtilen prosedürlere uygun olarak kaldırılıp vorteksle parçalanarak yeni bir shell vialde ikincil

pasajları yapıldı ve üremeleri kontrol edilerek olumlu sonuçlar doğrulandı. Bütün çalışmalarda olumsuz kontrol olarak, içine hasta örneği alınmamış bir CTM yöntemine uygun olarak ekildi ve boyandı.

5.5. Deney sonuçlarının analizi

Hücre kültüründeki sonuçlar altın standart olarak kabul edilerek, DFA ve OIA deneylerinin sonuçları duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve etkinlik bakımından karşılaştırıldı. Adı geçen parametreler aşağıdaki formüllere göre hesaplandı;

$$\text{Duyarlılık} : [G.P. / (G.P. + Y.N.)] \times 100$$

$$\text{Özgüllük} : [G.N. / (G.N. + Y.P.)] \times 100$$

$$\text{Pozitif Prediktif Değer (PPD)} : [G.P. / (G.P. + Y.P.)] \times 100$$

$$\text{Negatif Prediktif Değer (NPD)} : [G.N. / (G.N. + Y.N.)] \times 100$$

$$\text{Etkinlik} : [(G.P. + G.N.) / (G.P. + G.N. + Y.P. + Y.N.)] \times 100$$

G.P: Gerçek pozitif olgu sayısı

G.N: Gerçek negatif olgu sayısı

Y.P: Yalancı pozitif olgu sayısı

Y.N: Yalancı negatif olgu sayısı

PPD: Pozitif prediktif değer

NPD: Negatif prediktif değer

6.BULGULAR

Spekulum aracılığı ile yapılan fizik bakısında klinik olarak ıvegen veya süregen servisit ön tanısı alan, toplam 86 hastadan endoservikal sürüntü örneği alındı. Örneklere altısı çok hemorajik olması, beşi DFA bakısında değeriendirilebilecek düzeyde hücre bulunmaması nedeni ile nitelikli bulunmayarak toplam 11 örnek çalışmadan çıkarıldı. Hücreleri yetersiz bulunan beş örneğin ikisi aynı zamanda sonucu etkileyebilecek düzeyde mukus içermekteydi. Kalan 75 örnek hücre kültürü yöntemi referans alınarak değeriendirildi. Çalışmaya alınan 75 olgunun 14'ü servisit ile ilgili bir yakınması olmaksızın yapılan spekulum bakısında servisit saptanan kadınlardı ve bu olgulardan ikisinde DFA ve OIA sonuçlarında olumluluk görülmeksizin *C.trachomatis* üremesi saptandı. Hücre kültürü değeriendirmesinde toplam 24 olguda (%32) *C.trachomatis* üremesi saptanırken kalan 51 (%68) olguda üreme görülmeydi.

Hücre kültüründe üreme saptanan 24 olgudan 10'unda kasık ağrısı ve akıntı yakınması bulunurken, altısında yalnızca kasık ağrısı, altısında yalnızca akıntı öyküsü bulunmaktaydı. Diğer iki olgu ise servisit düşündürecek hiçbir klinik yakınması olmaksızın kontrol amacı ile polikliniğe başvuran kişilerdi. Yaşları 42 ve 51 olan olguların her ikisi de yapılan spekulum bakısında süregen servisit öntanıli olarak çalışma grubuna katıldı. Olguların her ikisinde de hücre kültürü pozitif bulunurken DFA ve OIA sonuçları negatifti.

İvegen servisit öntanısi alanlarda yaş ortalaması 31 ± 5 , süregen servisitlilerde 37 ± 9 olarak bulundu. İvegen sevisitli toplam 13 hastanın dört tanesi yalnızca kasık ağrısı, beş tanesi yalnızca akıntı, dört tanesi kasık ağrısı ve akıntı yakınmaları ile, süregen servisitli 10 hastanın altısı kasık ağrısı ve

akıntı, ikisi yalnızca kasık ağrısı, ikisi ise yakınması olmaksızın kontrol amacıyla polikliniğe başvurmuşlardı (Tablo 1).

Bu sonuçlar tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olgularda Test Sonuçlarının Yaş, Klinik Yakınma ve Bulgularla Karşılaştırılması

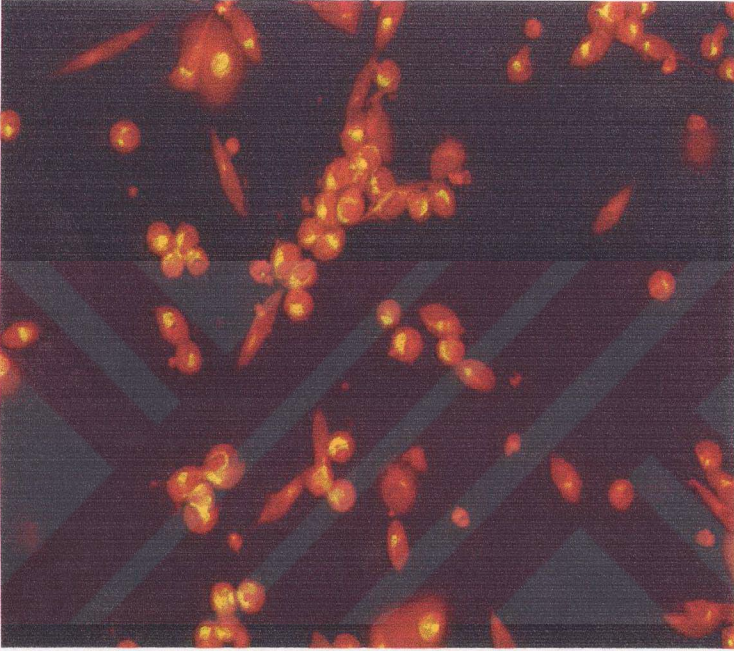
| Örn no | yaş | yakınma | klirik öntanı | DFA sonucu | OIA sonucu | Hücre kültürü sonucu |
|--------|-----|--------------|-----------------|------------|------------|----------------------|
| 37 | 51 | yok | sür.servisit | - | - | + |
| 45 | 42 | yok | sür.servisit | - | - | + |
| 24 | 25 | kasık ağrısı | ivegen servisit | - | + | + |
| 35 | 29 | kasık ağrısı | ivegen servisit | + | + | + |
| 39 | 41 | kasık ağrısı | sür.servisit | + | + | + |
| 42 | 40 | kasık ağrısı | sür.servisit | + | - | + |
| 33 | 31 | kasık ağrısı | ivegen servisit | + | + | + |
| 34 | 36 | kasık ağrısı | ivegen servisit | - | - | + |
| 46 | 35 | akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 40 | 36 | akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 31 | 30 | akıntı | servisit? | + | + | + |
| 43 | 29 | akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 27 | 25 | akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 17 | 27 | akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 44 | 40 | ağrı+akıntı | sür.servisit | - | + | + |
| 2 | 23 | ağrı+akıntı | sür.servisit | + | + | + |
| 6 | 39 | ağrı+akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 10 | 25 | ağrı+akıntı | sür.servisit | + | + | + |
| 21 | 26 | ağrı+akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 22 | 28 | ağrı +akıntı | sür.servisit | + | + | + |
| 7 | 38 | ağrı+akıntı | ivegen servisit | + | + | + |
| 12 | 43 | ağrı+akıntı | sür.servisit | + | - | + |
| 25 | 39 | ağrı+akıntı | ivegen servisit | - | - | + |
| 23 | 35 | ağrı+akıntı | sür.servisit | - | + | + |

Hücre kültürü çalışmaları *C.trachomatis*'e özgül FITC ile işaretlenmiş MOMP'a karşı monoklonal antikolar ile boyanarak immunfloresan mikroskopunda değerlendirildi (Fotoğraf 1-3). İlk değerlendirmeler sonunda, doğrulama amacıyla üreme saptanan örneklerden biri dışında ikincil pasaj yapıldı ve tümünde üreme saptandı. Üreme saptandığı halde yedeği kırıldığı için ikincil pasaj yapılamayan tek örneğin DFA ve OIA sonuçları da olumlu bulunduğundan, örnek çalışmadan çıkarılmadı.

75 örnek, fluorescein ile işaretli *C.trachomatis*'e özgül monoklonal antikoların (anti-MOMP) kullanıldığı DFA ve cinse özgül anti-LPS antikolarının kullanıldığı EIA yöntemi olan OIA ile de değerlendirildi. DFA ve OIA ile yapılan değerlendirmelerde, sırası ile 17 (%23) ve 25 (%33) olgu olumlu, 58 (%77) ve 50 (%67) olgu ise olumsuz bulundu. Bu sonuçlar tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: DFA, OIA ve Hücre Kültürü ile Elde Edilen Sonuçlar

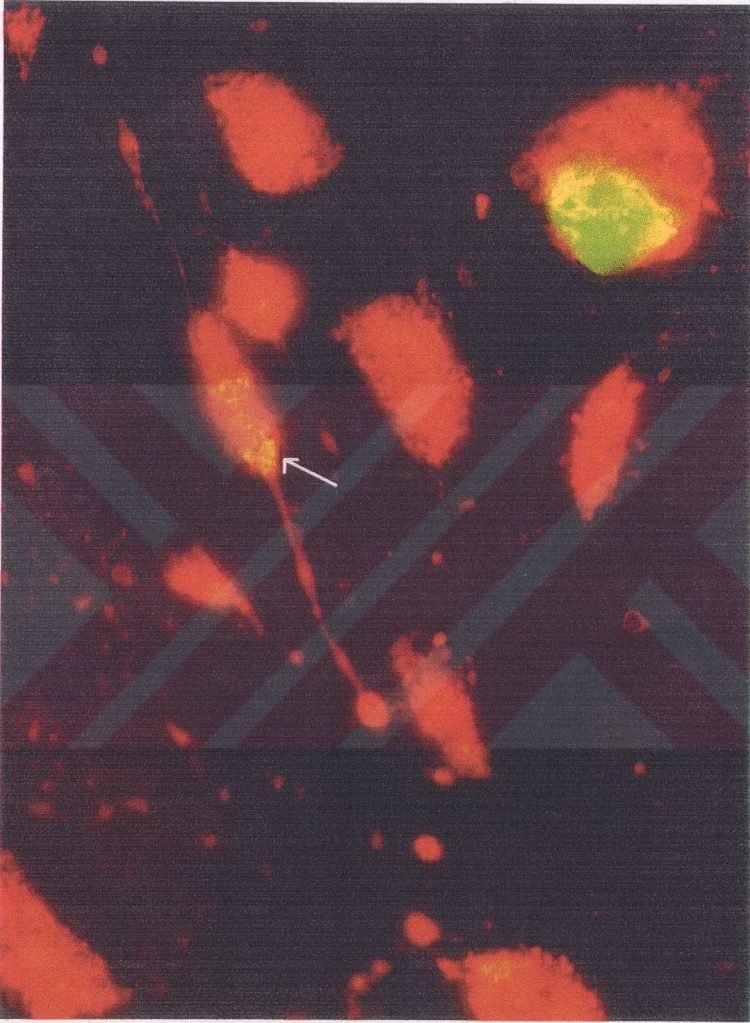
| HÜCRE KÜLTÜRÜ | | DFA | | OIA | |
|------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| | | + | - | + | - |
| + | 24 (%32) | 17 (%23) | 7 (%9) | 18 (%24) | 6 (%8) |
| - | 51 (%68) | 0 (%0) | 51(%68) | 7 (%9) | 44 (%59) |
| Toplam | 75 (%100) | 17 (%23) | 58 (%77) | 25 (%33) | 50 (%67) |



Mc Coy hücre serisinde *C.Trachomatis* İnküzyonları (FITC ile boyanmış x400)



McCoy hücre kültüründe üretilmiş intrastoplazmik *C.trachomatis* İnküzyonları (x1000)



C.trachomatis'in McCoy hücre kültüründeki elementer cisimcikleri (Okla işaretli) ve bir büyük inklüzyon cismi (x1000).

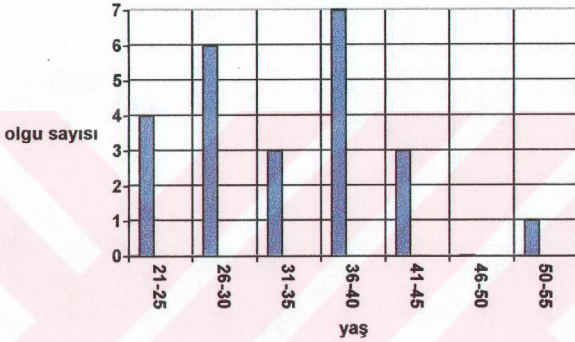
Hücre kültüründe üreme saptanan, ıvegen servisitli 13 hastanın 10'unda (%77) DFA, OIA ve hücre kültürü sonuçları olumlu bulunurken, ikisinde (%15) tek başına hücre kültürü olumlu, birinde (%8) ise DFA olumsuz, OIA ve hücre kültürü olumlu bulundu. Süregen servisitli 10 hastanın ikisinde (%20) tek başına hücre kültürü olumlu olarak saptanırken, dördünde (%40) her üç test olumlu, ikisinde (%20) DFA ve hücre kültürü olumlu OIA olumsuz, ikisinde (%20) de OIA ve hücre kültürü olumlu, DFA olumsuz olarak saptandı. Bu sonuçlar tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo 3: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olguların Klinik Öntanı ve Yakınmaları ile Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

| Klinik Öntanı | Yakınma Durumu | Hücre Kültürü | DFA | OIA |
|---------------|----------------|---------------|----------|----------|
| İvegen | Yakınma + | 13 (%100) | 10 (%77) | 11 (%85) |
| | Yakınma - | 0 (%0) | 0 (%0) | 0 (%0) |
| Toplam | 13 (%100) | 13 (%100) | 10 (%77) | 11(%85) |
| Süregen | Yakınma + | 8 (%80) | 6 (%60) | 6 (%60) |
| | Yakınma - | 2 (%20) | 0 (%0) | 0 (%0) |
| Toplam | 10 (%100) | 10 (%100) | 6 (%60) | 6 (%60) |

C.trachomatis üremesi saptanan olguların yaşlara göre dağılımına bakıldığında enfeksiyon sıklığının en fazla olduğu yaş grubu 36-40 olmakla birlikte genel dağılıma bakıldığında 20-40 yaşları arasında bir yoğunlaşma olduğu görüldü. Genel yaş dağılımı grafik 1'de gösterilmiştir.

Grafik 1: *C.trachomatis* Üremesi Saptanan Olguların Yaşlara Göre Dağılımı



DFA ve hücre kültürü sonuçları olumsuz, OIA'nın yalancı olumluluk verdiği yedi olgunun altısı süregen servisit öntanısı alırken, biri kuşkulu servisit ve miks vajinit olarak değerlendirildi.

Hücre kültüründe *C.trachomatis* üremesi saptanan olgularda antibiyotik kullanım öyküsü yoktu. Üreme saptanmayan 51 olgunun altı tanesinde örnek alınımından önceki iki hafta içinde antibiyotik kullanma öyküsü vardı. Bu olguların beş tanesi doksisisklin, bir tanesi ise siprofloksasin kullandığını belirtti. Doksisisklin kullanan bir olguda hücre kültürü ve DFA sonuçları

olumsuz, OIA ise olumluydu. Diğer antibiyotik kullanan olgularda ise her üç test sonucu da olumsuz bulundu.

Her olgu için elde edilen DFA ve OIA sonuçları hücre kültürü sonuçları ile karşılaştırıldığında toplam 15 olgu her üç yöntemle olumlu olarak bulunurken, 44 olgu ise her üç yöntemle olumsuz olarak bulundu. Tek başına DFA olumluluğu hiçbir olguda görülmezken, OIA için 7 olguda tek başına olumluluk bulundu. İki olgu DFA ve hücre kültüründe olumlu, OIA da olumsuz olarak bulundu. Üç olgu ise OIA ve hücre kültüründe olumlu bulunurken DFA da olumsuzdu. Çalışılan 75 hastanın her üç test ile elde edilen sonuçları Tablo 4'te toplu halde gösterilmektedir.

Tablo 4: DFA, OIA ve Hücre Kültürü Toplu Sonuçları

| n = 75 | HÜCRE KÜLTÜRÜ (+) | HÜCRE KÜLTÜRÜ (-) | TOPLAM |
|------------------|-------------------|-------------------|--------|
| DFA(+) ve OIA(-) | 2 | 0 | 2 |
| DFA(-) ve OIA(+) | 3 | 7 | 10 |
| DFA(-) ve OIA(-) | 4 | 44 | 48 |
| DFA(+) ve OIA(+) | 15 | 0 | 15 |
| TOPLAM | 24 | 51 | 75 |

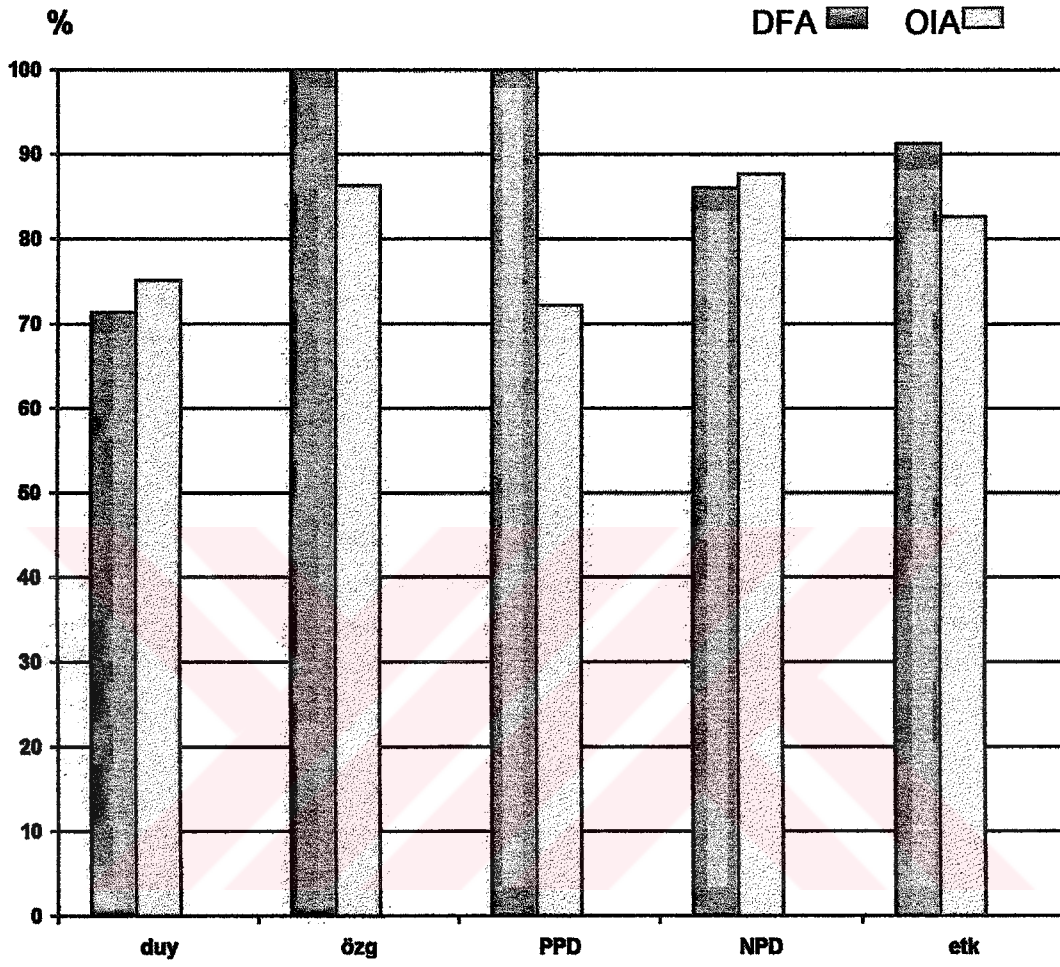
DFA ve OIA yöntemleri ile elde edilen ve tablo 4 de gösterilen sonuçların hücre kültürü altın standart kabul edilerek yapılan değerlendirmesinde, DFA yöntemi ile hiç yanlış olumlu sonuç saptanmazken OIA da 7 olgu yanlış olumlu olarak saptandı. Yanlış olumsuz sonuçlar ise her iki test için yakın değerlerdedi ve DFA için 7, OIA için 6 olguda yanlış olumsuzluk gözlemlendi. Dört olgu her iki test ile de yanlış olumsuz olarak saptandı (%5) ve bu olgular yalnızca referans testte olumlu bulundu. Bu sonuçlar tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: DFA ve OIA sonuçlarının referans yöntemle karşılaştırılması

| n = 75 (%100) | Gerçek Pozitif | Gerçek Negatif | Yanlış Pozitif | Yanlış Negatif |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| DFA | 17 (%23) | 51 (%68) | 0 (%0) | 7 (%9) |
| OIA | 18 (%24) | 44 (%59) | 7 (%9) | 6 (%8) |

Tablo 5 ile gösterilen sonuçlar, testlerin karşılaştırılmasındaki temel değişkenler olan duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve etkinlik hesaplanmasındaki ham verileri oluşturdu. Bu verilerin gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formüllerde yerlerine konması ile DFA ve OIA için sırası ile, duyarlılık; %71, %75, özgüllük; %100, %86, PPD; %100, %72, NPD; %86, %88 ve etkinlik; %91, %83 olarak bulundu (Grafik 2).

Grafik 2: DFA ve OIA testlerinin karşılaştırılması



Değerlendirme parametreleri

duy: Duyarlılık özg: Özgüllük etk: Etkinlik

PPD: Pozitif prediktif değer NPD: Negatif prediktif değer

7. TARTIŞMA

Bu çalışmanın tartışması *C.trachomatis* infeksiyonlarının görülme sıklığı, antibiyotik kullanımının test sonuçları üzerine etkileri, yöntemlerle ilgili uygulamada karşılaşılabilecek olası sorunlar, DFA sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi, OIA sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi alt konu başlıkları olarak incelenmiştir.

7.1. Görülme sıklığı

Dünya üzerinde her yıl 50 milyon yeni *C.trachomatis* olgusu geliştiği sanılmaktadır. Tek başına bu rakam bile bu infeksiyonun ne denli büyük bir sorun olduğunu ortaya koyabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 4 milyon yeni *C.trachomatis* infeksiyonu olduğu, cinsel aktif kadın popülasyonunda *C.trachomatis* görülme oranı %10, cinsel hastalıklar kliniğine başvuran hasta popülasyonunda ise %25-40 olarak bildirilmektedir. İnfekte annelerden doğan bebeklerde bu infeksiyona yakalanma oranı yaklaşık %65 tir (14,25). Kanada'da yapılan geniş kapsamlı epidemiyolojik bir çalışmada Manitoba'da PID ve ektopik gebelik nedeni ile kliniğe başvuran kadınların yaklaşık %74'ünde *C.trachomatis* etken olarak bulunmuştur (75).

Türkiye'de *C.trachomatis* infeksiyonlarının genel sıklığını gösteren kapsamlı çalışmalar henüz bildirilmemiş olmasına karşın İstanbul ve İzmirde yapılan bazı çalışmalar bu bölgelerdeki prevalans hakkında genel bir fikir vermektedir (15-18,20,21). İstanbul'da Genç ve arkadaşlarının (20) yaptığı bir çalışmada gebelerde *C.trachomatis* sıklığı %1.1 olarak bildirilmiştir. Yılmaz ve arkadaşlarının (21) çalışmasında ise seks çalışanı kadınlarda *C.trachomatis* ile infeksiyon sıklığı %22'dir. İzmir'de Dereli ve arkadaşlarının (15) DFA ve hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada semptomlu olgularda %42, semptomsuz olgularda %23 oranında *C.trachomatis* infeksiyonu saptandığı bildirilmiştir.

Yine İzmir yöresinde Ertem ve arkadaşlarının (16,17,18) DFA ile yaptığı çalışmalarda *C.trachomatis* sıklığı, kadın hastalıkları polikliniğine başvuran semptomlu ve semptomsuz kadınlarda %34.4, infertil kadınlarda %8.5, genelevde çalışan kadınlarda %25.4 olarak belirtilmiştir.

Ülkemizde *C.trachomatis*'e ilişkin hücre kültürüne dayalı çok çalışma bulunmamaktadır. Kadın hastalıkları polikliniğine değişik nedenlerle başvuran 75 olgu üzerinde yürütülen çalışmamızda hücre kültürü ile %32, DFA ile %23, OIA ile %33 oranında olumluluk saptadık (Tablo 1). Sonuçlarımız özellikle İzmir yöresinde Dereli ve arkadaşlarının (15) hücre kültürü ve DFA ile saptadıkları oranlarla uyumlu bulunmuştur. Dereli ve arkadaşlarına göre bu oranlar semptomatik kadınlarda %42, asemptomatiklerde %23'tür. Çalışmamızda ise olguların 22'si semptomatik olup olumluluk oranı %36'dır. Asemptomatik iki olgumuzda (%14) DFA ve OIA olumsuz bulundu ancak hücre kültüründe üreme saptanmadı.

Kadınlarda *C.trachomatis* öntanısının konması erkeklere göre zor ve olası komplikasyonları bakımından daha önemlidir. Vajinal akıntı, kanama, alt abdominal ağrı, disüri, *C.trachomatis* infeksiyonlarında sıklıkla görülen ancak özgül olmayan bulgulardır. Bir çok kadında bu semptomlar ortaya çıkmaksızın infeksiyon aylarca sürebilir. *C.trachomatis* servisitlerinde tipik olarak sarı renkli, mukopürülan akıntı, servikal ektopi, ödem ve kolayca kanayabilen servikal mukoza vardır. *C.trachomatis* ile infekte kadınlarda servisit ile birlikte üretrit tablosu da sıklıkla (43,44).

C.trachomatis üremesi saptadığımız 24 olgunun, altısında kasık ağrısı, altısında akıntı, 10'unda kasık ağrısı ve akıntı yakınmaları varken iki olguda hiçbir yakınma olmaması ilgi çekicidir. Bu hastalardan biri menapoz kontrolü, diğeri ise myoma uteri izlemi nedeniyle polikliniğe başvurmuşlardır. Bu iki olgu jinekolog tarafından yapılan spekulum bakısında süregen servisit olarak

değerlendirilmiş ve bu nedenle çalışma grubuna alınmıştır. Yaşları 42 ve 51 olan hastaların her ikisinde de hücre kültüründe olumluluk saptanmış yapılan OIA ve DFA çalışmaları ise yanlış olumsuz bulunmuştur, bu durum *C.trachomatis*'in tarama testleri ile yakalanamayacak kadar düşük düzeyde olması ile açıklanabilir. Çalışmamızda da Magder ve arkadaşlarının (76) çalışma bulgularına benzer durum saptanmıştır. Araştırmacılar özellikle yaşlı kadınlarda az sayıda inklüzyonun etken olduğu, düşük düzeyli infeksiyonlarda, EIA'nın duyarlılığında sorunlar ortaya çıktığını bildirmişlerdir (76).

Üreme saptanan olgularımızdan, akut servisitlilerin %77'sinde her üç test sonucu da olumlu olarak bulunurken, uyumsuz sonuçların oranı %23 olarak bulunmuştur. Süregen servisitlilerde ise aynı değerler sırası ile %40 ve %60 olarak saptanmıştır (Tablo 3). Bu sonuçlar bize özellikle süregen infeksiyonlularda tanısal testlerin duyarlılıklarında sorunlar yaşanabileceğinin bir başka göstergesidir. Aynı durum OIA'da özgüllüğü de etkilemektedir. DFA ve hücre kültürünün olumsuz olarak saptandığı yedi olgumuzun altısı süregen servisit olarak değerlendirilirken biri kuşkulu servisit ve miks vajinit olarak değerlendirilmiştir. Süregen olgularda, infeksiyona eşlik eden diğer bakteriyel etkenlere ait LPS yapılı, klamidiyal anti-LPS antikoları ile çapraz tepkime veren maddelerin ortamda bulunması testin özgüllüğünü düşürmektedir (13,70). Özellikle süregen olgularda infeksiyonun saptanmasında sorunlar vardır ve olası ise kültür yöntemlerine geçilmesini önermekteyiz.

Kanada'da yapılan bir çalışmada *C.trachomatis* ile infekte kadınların %72'si 15-24, %24'ü 25-39, %2'si ≤ 14 , %2'si de ≥ 40 yaş gruplarında saptanmıştır (75). Amerika Birleşik Devletlerinde de *C.trachomatis* infeksiyonlarının yaş gruplarına göre dağılımında en riskli yaş grubunun 20 yaş altındaki cinsel aktif genç kadınlar olduğu bildirilmiştir (13,77). Bu durumun nedenleri arasında özellikle genç kadınlarda skuamo-kolumnar

birleşme bölgesinde görülen farklılıklar nedeni ile *C.trachomatis*' in enfeksiyona duyarlı olan kolumnar epitele ulaşması ve bu bölgeyi tutması, genç kadınlarda daha kolay olmaktadır (13).

Araştırmamızda çalışma kapsamına alınan 75 olgunun tümü 20 yaş üzerinde ve evlidir. Hücre kültürü olumluluğu 20-40 yaş arasında toplanmış olup en sık görüldüğü yaş grubu da 7 olgu ile 36-40 yaşdır (Grafik1). Yaş gruplarındaki ayrıcalık, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'ndekilerle benzer gruplar olmaması ve çalışma kapsamındaki tüm olgularımızın evlilik nedeni ile cinsel aktif olmaları diğer çalışmalarla karşılaştırılmasını olanaksız kılmaktadır. Sonuçlarımız Ertem ve arkadaşlarının (16) DFA yöntemi kullanarak yaptıkları tarama çalışması ile uyumludur. Araştırmacılar en yüksek enfeksiyon oranlarını 30-40 yaş grubunda bildirmiştir. Ülkemizde aktif cinsel yaşama geçişin geç olduğu bir gerçektir bunun yanısıra 20 yaş altındaki kadınlarda gerçek sıklıkların gösterilmesinin, toplumsal ahlak değerleri nedeniyle hekime başvurmaları yeterli olmayacağından çok zor olacağını düşünmekteyiz.

7.2. Antibiyotik Kullanımının Test Sonuçları Üzerine Etkileri

Örnek alımından önceki iki hafta içerisinde rastgele antibiyotik kullanım öyküsü olan olguların hiçbirinde hücre kültüründe üreme saptanamamıştır. Bu olgulardan doksisiklin kullanım öyküsü olan birinde OIA sonucu olumlu bulunmuştur. Bu durumun sebebini Roblin ve arkadaşlarının (70) çalışmasında olduğu gibi, ortamda ölü *C.trachomatis*'e ait antijenler bulunduğu biçiminde yorumlanabilirse de aynı örneğin DFA sonucunun olumsuz olması bu olasılığı zayıflatmaktadır. Çünkü ortamda bulunan ölü *C.trachomatis* antijenlerinin DFA yöntemi ile de saptanabilmesi gerekir (16). Ancak yinede DFA ile OIA testlerinde kullanılan antijenik yapıların farklı olması nedeni ile bu olasılık tamamen gözardı edilmemelidir. Bu durum hücre

kültürü uygulamalarının zayıf noktası olarak karşımıza çıkmakta ise de ortamda canlı etken bulunmadığı için hastanın alacağı sağaltım sonucuna etkisi önemsizdir.

7.3. Yöntemlerle İlgili Uygulamada Karşılaşılabilecek Olası Sorunlar

C.trachomatis tanısında kullanılan testlerin uygulanabilirliğinin araştırılmasında, maliyet, örneklerin alımı ile ilgili sorunlar, örneklerin taşınması ile ilgili sorunlar, araç, gereç ve donanımlarla ilgili sorunlar ve değerlendirmede karşılaşılabilecek sorunlar dikkate alınmalıdır.

1. Örneklerin alınması ile ilgili sorunlar:

Yapılacak testlerin gereksindiği uygun özellikte örneklerin alınması, çalışma sonucunu birincil olarak etkileyen değişkenlerden biridir. Bu çalışmada kullanılan testlerde de örnek alımı ile ilgili sorunlarla zaman zaman karşılaşmıştır. Toplam 11 hasta örneği aranılan özellikte olmadığı için çalışmadan çıkarılmıştır. Bu örneklerin altı tanesi, çok hemorajik olarak değerlendirilmiştir. Hemorajik örnekler ile çalışılmama nedeni hücre kültürüne olası toksik etkileri ve OIA çalışmasının sonuçlarını etkilemesidir. Kanın içindeki kompleman gibi maddeler hücre serilerine toksiktir. Hücre kültürü uygulamasında kullanılan FBS'nin ısı ile inaktive edilmesinin nedeni de budur. Diğer beş örnek ise yapılan DFA bakısında hücre sayısı yetersiz olduğu için uygun örnek olarak değerlendirilmemiş ve çalışmadan çıkarılmıştır. Toplanan örneklerde yeterli sayıda hücre bulunmaması OIA içinde önemli bir sorundur. Bu konuda DFA tekniğinin önemli avantajı örneğin yeterliliğinin değerlendirilebilir olmasıdır, OIA tekniğinde ise böyle bir değerlendirme yapmak olanaksızdır ve hatalı olumsuzluklara yol açabilir (15,16,51,52).

Çalışmada uygulanan antijen arama tekniklerinde, örnek alımı sırasında toplanan örneğin kalitesini etkileyen önemli bir diğer faktör de ekzoservikal mukus bulaşdır (13). Örnek alımı yapılmadan önce ekzoservikal mukusun temizlenmesi gerektiği bildirilmiştir. İyi temizlenemeyen mukusun OIA ve DFA testlerinin değerlendirilmesinde yanlış olumluluklara neden olacağı bildirilmiştir (13,70). Bu çalışmada mukus bulaşı olan iki örnek aynı zamanda hücre sayıları da yetersiz olduğu için çalışmadan çıkarılmıştır. Böyle durumlarda mukusun yoğun olduğu ve iyi temizlenemediği zaman örnek alımı sırasında hücrelerin de yetersiz toplanmasına neden olduğu söylenebilir.

Kadınlarda servikal sürüntülerle birlikte üretral sürüntü örneği alınmasının kültür duyarlılığını %23 arttırdığı bildirilmiştir (45). Bu çalışmada tarama testlerinin etkinlikleri yalnızca servisit etkeni olan *C.trachomatis* infeksiyonlarında araştırıldığından üretral sürüntü örneği alınmamıştır.

2. Örneklerin taşınması ile ilgili sorunlar:

Toplanan örneklerin işlemleninceye kadar bulunduğu taşıma koşulları testlerin sonuçlarını doğrudan etkileyen bir etmendir. Bu çalışmada örneklerin taşınması ile ilgili bir sorunla karşılaşılmamıştır. DFA için alınan örnekler hemen hasta başında lamlara sürülerek havada kurutulduktan sonra metanolle fikse edilmiş ve aynı gün içinde işleme alınmıştır. OIA ise örnek alınır alınmaz hasta başında çalışılmıştır. Çalışmada örnek taşınmasının en önemli olduğu test, hücre kültürü yöntemi olmuştur. Bu yöntem için toplanan örneklerden alındıktan sonra 2 saat içinde inoküle edilmeyenler +4°C de saklanmış ve en geç 8 saat içinde işleme alınmıştır (13,56,23).

3. Araç, gereç ve donanım ile ilgili sorunlar:

Tanısal testlerin uygulanabilirliği konusunda kısıtlayıcılığı en önce gelen sorunlardan biri de araç, gereç ve donanımdır. Bu çalışmada karşılaştırılan antijen arama deneylerinden, DFA testi kit içeriği ve silgeç dışında pipet, şale ve İmmunfloresan mikroskobu gibi donanım ve araçlara gerek göstermektedir. OIA testi uygulaması için ise silgeç dışında gerekli tüm araç ve gereçler kitin içinden çıkmaktadır. Bu özelliği OIA testini genel ve hızlı taramalarda avantajlı kılmaktadır. Hücre kültürü yöntemi ise ayrıntıları gereç ve yöntem bölümünde verilen yoğun bir malzeme ve donanım listesi gerektirmektedir. Bu özelliği ile hücre kültürünün, bir doğrulama testi olmasına karşın genel taramalarda kullanılması uygulanabilir değildir.

4. Sonuçların değerlendirilmesi ile ilgili sorunlar:

Hücre kültürü çalışmalarında inkübasyon sonrasında inklüzyonların görünür duruma getirilmesi aşamasında Giemsa veya İyotla boyama gibi yöntemler kullanılabilirse de fluoresein ile işaretli monoklonal antikolarla boyama yönteminin en duyarlı ve özgül yöntem olduğu bildirilmiştir (61,63). Giemsa ile boyanan inklüzyonların belirlenmesi kolay olmasına karşın bazı boya kalıntılarının ya da ölü hücrelerin inklüzyon olarak yorumlanmasının mümkün olduğu, glikojen için seçici bir boya olan iyotla boyamada ise duyarlılığın düşük olduğu ve özellikle endoservikal örneklerden yapılan hücre kültürü çalışmalarında servikal kolumnar hücrelerin de yüksek miktarda glikojen içermesi nedeniyle yanlış olumlulukların çok artabileceği bildirilmiştir (13,23).

Yukarıda sözü edilen boyama yöntemlerinden birinin kullanıldığı her durumda sonuçların değerlendirilmesi için deneyimli bir göze gerek vardır. Özellikle boya artıklarının oluşturabileceği yanlış olumluluklar ve alanların yetersiz incelenmesi, az sayıda hatta bazen tek bir inklüzyon cisimciği içeren örneklerde görülebilecek yanlış olumsuzluklar, deneyimsiz bir değerlendiricinin karşılaşılabileceği sorunlardır. Bu çalışmadaki hücre kültürü değerlendirmelerinde sözü edilen durumlarla zaman zaman karşılaşılmıştır. Özellikle az sayıda inklüzyon cismi olan örneklerde, inklüzyonların net olarak tanımlanamadığı durumlarda örneklerin ikincil pasajları, daha kesin ve doğru bir değerlendirme yapılmasını sağlamıştır.

DFA testi değerlendirmesinde de hücre kültüründe karşılaşılan sorunlar söz konusudur, ancak değerlendiricinin deneyimi DFA yönteminde çok daha ön plandadır. DFA lamalarında genellikle büyük inklüzyon cisimlerinden çok küçük elementer cisimlerin bulunması değerlendiricinin daha özenli ve deneyimli olmasını gerektirmektedir. Bu yöntemin uygulamasında kullanılan monoklonal antikorların tipi de önemlidir. DFA tekniğinde kullanılan işaretli antikorlardan MOMP'a özgül olanların, elementer cisimleri LPS'ye özgül olanlara göre, daha parlak, belirgin ve tipik olarak boyadığı bildirilmiştir (79).

Bu çalışmada kullanılan CHLAMYSET®ANTIGEN kiti türe özgül MOMP'a karşı oluşan antikorlardan üretilmiştir. Bu nedenle elementer cisimlerin tanımlanması ile ilgili bir sorunla karşılaşılmamıştır. Elementer cisimler, oval veya yuvarlak, parlak elma yeşili renkte, konak hücrelere göre çok küçük olan tipik morfolojilerinde görüldü. İncelenen DFA lamalarının hiçbirinde inklüzyon cisimine rastlanmadı.

OIA yöntemi ise kullanılan kitin bir hızlı test ve sonuçlarının çıplak gözle değerlendirilebilir olması nedeniyle deneyimli bir değerlendiriciye

gereksinmemektedir. Yalnızca değerlendirme açısından bakıldığında en kullanışlı testin OIA olduğu söylenebilir.

5. Testlerin sonuca ulaşma süreleri

Kullanılan DFA yönteminde örnekler toplandıktan ve lamaların kurutulup fikse edildikten sonra sonuç alınincaya dek geçen süre toplam 20-25 dakikadır. Hızlı OIA için ise bu süre yaklaşık 30 dakikadır. Her iki yöntem de oldukça hızlı sonuç vermektedir. Hızlı sonuç verme, tarama testleri için aranan, önemli bir niteliktir. Özellikle hastaya çabuk ve etkin bir sağaltımın başlatılabilmesi tanının hızlı konmasına bağlıdır. Sözü edilen her iki yöntem de bu konuda yeterli düzeyde hızlıdır. Ancak OIA'nın çıplak gözle değerlendirilebilmesi ve DFA gibi, teknik donanıma gereksinmemesi tanıya gidişte süre bakımından da bir avantaj sağlamaktadır. Hücre kültüründe ise ilk sonuçlar en erken 48. saatin sonunda alınabilmektedir (62). Bu özelliği, hücre kültürünün pratik bir tarama testi olmasının en önemli engellerinden biridir.

7.4. DFA sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi

DFA yöntemi ile *C.trachomatis* aranmasında kullanılan ticari kitler, iki tip antikordan birini içermektedir. Bunlar;

1. Cinse özgül klamidyal LPS antijenine karşı oluşan Anti-LPS antikoru
2. *C.trachomatis*'in MOMP una karşı oluşan türe özgül antikordur.

Bu çalışmada DFA uygulaması, *C.trachomatis*'le ilişkili MOMP'a özgül monoklonal antikoru kullandığı ticari bir kit olan CHLAMYSET® ANTİGEN (Orion diagnostica) ile yapılmıştır.

DFA sonuçlarının hücre kültürü altın standart kabul edilerek yapılan çözümlemesinde DFA'nın duyarlılığı %72, özgüllüğü %100, PPD'i %100, NPD'i %87 ve etkinliği %90 olarak bulunmuştur.

Schwebke ve arkadaşlarının (51) yaptığı bir çalışmada MOMP'a özgül antikörlerin kullanıldığı bir DFA kitinin, hücre kültürü ile karşılaştırılmasında, duyarlılığı %90, özgüllüğü %99.8, PPD'i %97.4, NPD'i %99.1 olarak bildirilmiştir. Bulgularımız Schwebke ve arkadaşlarının sonuçları ile yakınlık göstermekle birlikte çalışmamızda DFA'nın duyarlılığı daha düşük olarak saptadık. Benzer durum Quinn ve arkadaşlarının (80) yaptığı çalışmada da görülmüştür. Bu çalışmada DFA tekniğinin, hücre kültürü ile karşılaştırılmasında duyarlılığı %92, özgüllüğü %99 bulunmuştur. Bunun nedeni kullandıkları hücre kültürü yönteminden kaynaklanıyor olabilir çünkü her iki çalışmada da hücre kültürü yöntemi olarak 96 çukurlu mikropklarda üretilmiş hücre serilerine inokülasyon yapılmıştır. Bu uygulamanın, gerek mikropklarin kuyucuklarına inoküle edilebilen örnek miktarının görece azlığı, gerekse mikropklarin santrifüj işleminin daha düşük devirlerde yapılabilmesi nedeniyle bizim altın standart uygulamamız olan shell vial yöntemine göre daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir (13,64,61). Schwebke ve Quinn'in, çalışmalarında uyguladıkları altın standartın duyarlılığının, shell vial tekniğine göre düşük olması, DFA'nın duyarlılığını bizim çalışmamıza göre daha yüksek bulmalarının nedeni olsa gerektir.

DFA'nın özgüllüğü ve pozitif prediktif değerleri ise özellikle MOMP'a özgül antikörlerin kullanıldığı çalışmalarda % 98-99 olarak bulunmuştur (51,80). Bu değerler bizim çalışmamızın bulguları (her ikisi de %100) ile uyumluydu.

DFA testi, tıpkı hücre kültürü gibi klamidiyal inklüzyonların ve/veya elementer cisimlerin ayırıcı biçim ve boyanma özelliklerinin görüntülenmesi

temeline dayalı olduğundan, özgüllüğü bu denli yüksek olarak saptanabilmektedir.

MOMP'a ilişkin monoklonal antikorların kullanıldığı DFA yöntemi, hızlı sonuç veren *C.trachomatis* testleri içinde en özgül olanıdır tanımı yanlış olmaz. Ancak yine de bu testin doğru olarak değerlendirilebilmesi için deneyimli bir değerlendiriciye gereksinim vardır. Bu yöntemin özgüllüğüne etki eden en önemli etkenler, değerlendirmedeki nesnellik ve insan etmenidir. Özellikle <10 sayıda elementer cisim saptanan örneklerde yinelemenin doğru tanı açısından uygun bir yaklaşım olacağı bildirilmiştir (13).

7.5. OIA sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi

C.trachomatis tanısında kullanılan hızlı veya hasta başı olarak anılan testler, OIA teknolojisi tabanında hazırlanmış, membran kaplaması veya lateks immunodifüzyon modelleridir (13,70,81,84). Hızlı testlerin genelde doktor ofislerinde ya da aylık 100 testten az örnek gelen küçük laboratuvarlarda kullanıldığı bildirilmiştir (81). Bu tür testler uygulaması kolay, fazla donanıma gereksinmeyen, yalcaşık 30 dakika içinde sonuç veren ve sonuçları çıplak gözle kalitatif olarak okunabilen niteliktedir.

Bu çalışmamızda kullanılan Biostar OIA ®Chlamydia test 25 dakika içinde sonuç veren, örnek alımı için gerekli olan dakron silgeçler haricinde ek donanıma gereksinmeyen ve sonuçları direk ışık altında verdiği metalik yansımaya bakılarak çıplak gözle değerlendirilebilen bir EIA tabanlı yöntemdir. Testin değerlendirmesinde bakılan yansıtıcı yüzeyin kaplandığı ince film tabakası, özgül dalga boylarının yansımada değişiklikler oluşturabilen duyarlı bir yapıdadır. Ekstrakte edilen örnekte bulunan klamidyal LPS (eğer varsa) bu yüzeyin üzerine konduğunda filme bağlanır, daha sonra üzerine horseradish peroxidase-antiLPS içeren konjugat ve ardından substrat

eklenir ve bunlarda önceden yüzeye bağlı bulunan antijenlerle etkileşerek birleşirler. Antijen-antikor etkileşimi sonucu oluşan yoğunlaşma artışı, yansıtıcı yüzeye düşen ışığın izlediği optik yolu değiştirerek yüzeyde renk değişikliğine yol açar. Olumlu olgularda altın sarısı metalik yansıma veren OIA yüzeyinde mora doğru giden bir renk değişikliği oluşur (70).

Bu çalışmada yapılan OIA uygulamalarında, toplam 25 (%33) olgu olumlu olarak bulunmuş ve bunların 18 tanesi altın standarda göre gerçek olumluluk olarak değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalı çözümlenmelerde OIA'nın duyarlılığı %75, özgüllüğü %86, PPD i %72, NPD i %88 olarak bulunmuştur. Roblin ve arkadaşlarının (70) yeni doğanlardan toplanan göz sürüntülerinden, McCoy hücre kültürünü altın standart kullanarak yaptıkları toplam 152 hastalık, retrospektif çalışmada aynı testin duyarlılığı, özgüllüğü, PPD ve NPD leri sırası ile, %94.2, %97, %94.2, %97 olarak bildirilmiştir. Toplam 37 hastalık prospektif çalışmalarında ise aynı değerleri sırası ile, %100, %92.6, %83.3, %100 olarak bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızdan oldukça farklı olan bu değerlerin, çalışılan örneklerin ve kullanılan hücre kültürü yöntemlerinin farklılıklarından kaynaklandığı söylenebilir. Endoservikal kanaldan toplanan örneklerde, özellikle gram negatifler gibi bulunma olasılığı yüksek olan bakterilerle ilişkili LPS'nin Chlamydial Anti-LPS ile çapraz etkileşimi bildirilmiştir (13). Bu tür etkileşimler olasılıkla OIA'nın bizim çalışmamızdaki özgüllüğünü düşürmüştür, konjunktiva sürüntülerinde bu tür bakterilerin bulunma olasılığı daha düşüktür. Çalışmalar arasındaki duyarlılık farkı ise Roblin ve arkadaşlarının (70)'nin altın standart olarak kullandığı mikropalak yönteminin duyarlılığının shell vial yöntemine göre daha düşük olması ile açıklanabilir (82).

Diğer hızlı testlerin kullanıldığı, hücre kültürü ile karşılaştırmalı ve özellikle servikal sürüntü örneklerinin incelendiği çeşitli çalışmalarda hızlı testlerin

duyarlılıkları % 48-73, özgüllükleri %98-99, PPD leri %73-94, NPD leri % 96-99 arasında bildirilmiştir (83,84). Bu değerlere bakıldığında, kullanılan hızlı testlerin duyarlılıklarının bizim çalışmamızdaki değere yakın olduğu söylenebilir, ancak özgüllükleri oldukça farklıdır, bunun nedenini sadece kullanılan kitlerin farklılığına bağlamak yeterli bir yaklaşım olmaz çünkü bütün hızlı test kitlerinde bu çalışmadaki ile aynı olan cinse özgül anti-LPS antikorları kullanılmaktadır. Burada sorulması gereken soru bizim çalışmamızda OIA için toplanan örneklerin kalitesinin yeterliliğidir. Toplanan örneklerin niteliği test sonuçlarının performansını doğrudan etkileyen bir değişkendir (13,22,23). Özellikle servikal sürüntü örneklerinde iyi temizlenememiş, çeşitli yangı hücreleri ve bakteriler içeren mukus veya akıntı, testlerin içerdiği anti-LPS ile çapraz etkileşime giren maddeler taşıyabilir. Alınan klinik örneklerin kalitesinin kontrol edilememesi, hızlı testlerin sonuçlarında karşılaşılabilecek çözümü zor sorunlardan biridir. Bu sorunun ortadan kaldırılması için hızlı testlerde kullanılan antikorların değiştirilmesi ve daha özgül olan anti-MOMP kullanılması teknik olarak zordur. Anti-LPS, anti-MOMP a göre hem elde edilmesi daha kolay hem de çözünürlüğü daha yüksek olan bir antikordur. Bu nedenlerle anti-LPS, EIA teknolojilerinde daha kullanışlıdır (13,85).

Yalancı olumlulukların böylesine sorun yaratması hızlı testlerin, düşük risk gruplarında, düşük prevalanslı topluluklarda ve semptomsuz olgularda kullanılabilirliğini engellemektedir. Hızlı testlerin en önemli avantajı hemen sonuç vererek, hasta henüz doktorun ofisinden ayrılmadan sağaltımının yönlendirilmesine olanak vermesidir. Hastanın klinik bulguları ile uyumlu olumlu hızlı test sonuçları klinisyene bir fikir verebilir ancak bu sonuçların diğer laboratuvar tanı yöntemleri ile doğrulanması gerekmektedir (13).

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Klinik olarak servisit öntanısı ile çalışmaya alınan olgularda hücre kültürü ile %32 olumluluk saptanmıştır. Bu oran yurdumuzda ve dünyadaki çeşitli yayınlarda bildirilen oranlarla uyumludur ve *C.trachomatis* infeksiyonlarının Türkiye için de önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. İnfeksiyonun sinsi seyretmesi ve oluşturduğu geç klinik sekeller, doğru tanının önemini arttırmaktadır.

Karşılaştırmalı bulgularımıza göre DFA tekniği OIA'e göre daha etkin bulunmuştur. Bu noktada OIA'in verdiği yanlış olumlu sonuçlar bu yöntemin etkinliğini düşüren en önemli etmendir. Hızlı testler her ne kadar uygulama kolaylığı, hızlı sonuç verme ve maliyet bakımından daha kullanışlı ise de sonuçlarının bir başka teknikle doğrulanması gerekmektedir bu da ek iş ve maddi yük getirmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre laboratuvarımızda düşük risk gruplarının veya semptomsuz olguların taranmasında DFA tekniği daha uygun bulunmakla birlikte klinik açıdan *C.trachomatis* infeksiyonu düşünülen olgularda hücre kültürü tekniğinin uygulanması yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle, sağaltım ve sağaltım sonrası izlemlerde bir gerekliliktir.

9. KAYNAKLAR

1. Schachter J, Stamm WE: Chlamydia "Murray P et al. (Ed) Manual of Clinical Microbiology" P669-670, ASM Press, Washington D. C. (1995).
2. Halberstaedter L, Von Provazek S: Zur Aetiologie des Trachoms. Deutsch. Med. Wschr. 33: 1285-1287 (1907).
3. Osser S: Consequences of genital chlamydial infection in women Osser (Ed) P6-7, Graphic systems AB, Malmö (1989).
4. Gordon FB, Quan AL: Isolation of the trachoma agent in cell culture. Proc. Soc. Biol. Med. 118: 354-359 (1965).
5. Moulder JW: The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses . Ann. Rev. Microbiol. 20: 107-130 (1966).
6. Sarov I, Becker Y: RNA in the elementary bodies of trachoma agent. Nature. 217: 849-852 (1968).
7. Sarov I, Becker Y: Trachoma agent DNA. J. Mol. Biol. 42: 581-589, (1969).
8. Weiss E: Adhenosine triphosphate and other requirements for the utilization of glucose by agents of the psittacosis-trachoma group. J. Bacteriol. 90: 243-253 (1965).

9. Wang S-P, Grayston JT: Immunological relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venerum, and related organisms in a new microtitre indirect immunofluorescence test. *Am. J. Ophthalmol.* 70: 367-374 (1970).
10. Wang S-P, Grayston JT, Alexander ER, Holmes KK: Simplified microimmunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venerum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1: 250-255 (1975).
11. Grayston JT, Wang S: New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause. *J. Infect. Dis.* 132: 87-105 (1975).
12. Wang SP, Grayston JT: Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia, and L2a. *J. Infect. Dis.* 163: 403-405 (1991).
13. Black CM: Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 160-184 (1997).
14. Hillis SD, Nakashima A, Marchbanks PA, Addiss DG, Davis JP: Risk factors for recurrent *C. trachomatis* infections in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170: 801-806 (1994).
15. Dereli D, Ertem E, Serter D, Yüce K: Evaluation of a direct fluorescent antibody test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *APMIS.* 99: 961-964 (1991).
16. Ertem E., Dereli D, Serter D, Yüce K: Screening for *Chlamydia trachomatis* in a Turkish population. *Genitourin. Med.* 67: 354 (1991).

17. Ertem E, Dereli D, Serter D, Tavmergen E, Çapanoğlu R: İnfertil kadınlarda *Chlamydia trachomatis* insidansı. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg. 21: 47 (1991).
18. Ertem E, Dereli D, Serter D, Engin Ö: İzmir genelevinde çalışan kadınlarda *Chlamydia trachomatis* araştırılması. Mikrobiyol. Bült. 27: 335 (1993).
19. Dereli D, Ertem E, Serter D, Köse S, Haznedaroğlu G: Konjunktival örneklerde *Chlamydia trachomatis* araştırılması. Mikrobiyol. Bült. 327: 127 (1993).
20. Genç M, Ağaçfıdan A, Yeğenoğlu Y, Turan Ö, Kuru ü, Mardh P-A: Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in pregnant Turkish women. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 395 (1993).
21. Yılmaz G, Türkoğlu S, Gerikalmaz Ö, Badur S: İstanbulda hayat kadınlarında *Chlamydia trachomatis* infeksiyonu prevalansının enzim immunoassay (EIA) ve İmmunofloresan (DFA) yöntemleri ile saptanması. 6. Ulusal Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi, Özet kitabı s:237, Antalya, (6-10 Mayıs 1991).
22. Cengiz AT, Kıyan M, Cengiz L, Uğurel Ş: *Chlamydia trachomatis* infeksiyonlarında laboratuvar tanı yöntemleri. Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg. 21: 359-379 (1991).
23. Ağaçfıdan A: *Chlamydia trachomatis* infeksiyonlarının tanısında laboratuvar yöntemlerin yeri. Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg. 23: 100-104 (1993).
24. Chernesky MA, JB Mahoney, S Castriciano, M Mores, IO Stewart, SF Landis, W Seidelman, ve ark: Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by

- enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J. Infect. Dis.* 154: 141-148 (1986).
25. Zhang JP, Stephens RS: Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eucaryotic host cells . *Cell* 89: 881 -889 (1992).
26. Bose SK, Goswami PC: Enhancement of adherence and growth of *Chlamydia trachomatis* by Estrogen treatment of HeLa cells . *Infect. Immunol.* 53: 646 -650 (1986).
27. Ustaçelebi Ş: Bacteriology and molecular biology of Chlamydiae "Serter D et al: FEMS workshop Human Chlamydial Infections " P. 9-23 , Ege Üniversitesi Basımevi Bornova İzmir (1997) .
28. Moulder J W: Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55: 143-190 (1991).
29. Brade L, Schramek S, Schade U, Brade H: Chemical, biological and immunochemical properties of *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 54: 568-574 (1986).
30. Newhall WJ, Jones BR: Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydia . *J. Bacteriol.* 154: 998-1001 (1983).
31. Stephens RS , Mullenbach G , Sanchez-Pescador R , Agabian N: Sequence analysis of the major outer membrane protein gene from *C. trachomatis* serovar L2 . *J. bacteriol.* 168: 1277-1282 (1986).

32. Gaydos CA, Quinn TC, Bobo LD, Eiden JJ: Similarity of *Chlamydia pneumoniae* strains in the variable domain IV region of the major outer membrane protein gene. *Infect. Immun.* 60: 5319-5323 (1992).
33. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT: Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58: 93-97 (1990).
34. Caldwell HP, Perry LJ: Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 38: 745-754 (1982).
35. Allen JE, Stephen RS: Identification by sequence analysis of two-site posttranslational processing of the cysteine-rich outer membrane protein 2 of *Chlamydia trachomatis* serovar L2. *J. Bacteriol.* 171: 285 -291 (1989).
36. Zhang YX, Watkins NG, Stewart S, Caldwell HD: The low molecular weight mass, cysteine rich outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* possesses both biovar- and species- specific epitopes. *Infect. Immun.* 55: 2570-2573 (1987).
37. Kaufmann SHE: Heat shock proteins and immune response. *Immunol. Today.* II: 129 -136 (1990).
38. Danilition S L, Mac Lean I W, Peeling R et al: The 75-Kilodalton Protein of *Chlamydia trachomatis*: A member of the heat shock protein 70 family? *Infect. Immun.* 58: 189 -196 (1990).

39. Wenman WM, Meusser RV: *Chlamydia trachomatis* elementary bodies possess proteins which bind to eucaryotic cells. J. Bacteriol. 169: 5152-5156 (1987).
40. Kaul R, Roy KL, Wenman WN: Cloning expression and primary structure of a *Chlamydia trachomatis* binding protein. J. Bacteriol. 169: 5152-5156 (1987).
41. Harrison HR, Costin M, Meder JB, Bownds LM, Sim DA, Lewis M, Alexander ER: Cervical *Chlamydia trachomatis* infection in university women: relationship to history, contraception, ectopy, and cervicitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 153: 244-251 (1985).
42. Esen T, Erdoğan T, Ander H: Genitoüriner sistemin *Chlamydia trachomatis* infeksiyonları. Anđ Ö et al. (ed), *Chlamydia infeksiyonları ve tanıda yenilikler*. S: 12, Türk Mikrobiyoloji cemiyeti, İÜ Basımevi ve Film merkezi İstanbul (1994).
43. Brunham RC, Paavonen J, Stevens CE, Kiviat N, Kuo CC, Critchlow CW, Holmes KK: Mucopurulent cervicitis - the ignored counterpart in women of urethritis in men. N. Engl. J. Med. 303: 1-6 (1984).
44. McCormack WM, Alport S, McComb DE, Nickols RL, Semine DZ, Zinner SH: Fifteen-month follow up study of women infected with *C.trachomatis*. N. Engl. J. Med. 300: 123 - 125 (1979).
45. Jones RB, Kate BP, Van der Pol B, Caine VA, Batteiger BE, Newhall WJ: Effect of blind passage and multiple sampling on recovery of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. J. Clin. Microbiol. 24: 1029 - 1033 (1986).

46. Stamm WE, Guinan ME, Johnson C, Starcher T, Holmes KK, McCormack WM: Effect of treatment regimens for *Neisseria gonorrhoeae* on simultaneous infection with *Chlamydia trachomatis*. N. Engl. J. Med. 310: 545-549 (1984).
47. Paavonen J, Kiviat N, Brunham RC, Stevens CE, Kuo CC, Stamm WE, Miettinen A, Soules M, Eschenbach DA, Holmes KK: Prevalance and manifestations of endometritis among women with cervicitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 152: 280-286 (1985).
48. Svensson L, Weström L, Ripa KT, Mardh PA: Differences in some clinical and laboratory parameters in acute salpingitis related to culture and clinical findings. Am. J. Obstet. Gynecol. 138: 1017-1021 (1980).
49. Shannan D, Gau D: Chlamydial *Fitz-Hugh / Curtis* Syndrome. Lancet 24: 1216 (1986).
50. Paavonen J, Saikku P, Von Knorring J: Association of infection with *Chlamydia trachomatis* with *Fitz-Hugh-Curtis* Syndrome. J. Infect. Dis. 144: 176 (1981).
51. Schwebke JR, Stamm WE, Handsfield HH: Use of sequential enzyme immunoassay and direct fluorescent antibody tests for detection of *Chlamydia trachomatis* infections in women. J. Clin. Microbiol. 28: 2473-2476 (1990).
52. Mocada J, Schachter J, Bolan G, Engelman J, Howard L, Mushahwar I: Confirmatory assay increases specificity of the Chlamydiazyme test for *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix. J. Clin. Microbiol. 28: 1770-1773 (1990).

53. Mocada J, Schachter J, Shipp M, Bolan G, Wilber J: Cytobrush in collection of cervical specimens for detection of *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. 27: 1863-1866 (1989).
54. Weiland TL, Noller KL, TF Smith, SJ Ory: Comparison of dacron-tipped applicator and cytobrush for detection of chlamydial infections. J. Clin. Microbiol. 26: 2437-2438 (1988).
55. Kellogg JA, Seiple JW, Klinedinst JL, Levisky JS: Comparison of cytobrushes with swabs for recovery of endocervical cells and for Chlamydiazyme detection of *Chlamydia trachomatis*. J. Clin. Microbiol. 30: 2988-2990 (1992).
56. Mahony JB, Chernesky MA: Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 22: 865-867 (1985).
57. Reeve P, j Owen, JD Oriel: Laboratory procedures for the isolation of *Chlamydia trachomatis* from the human genital tract. J. Clin. Pathol. 28: 910-914 (1975).
58. Ossewaarde JM, M Rieffe: Storage conditions of *Chlamydia trachomatis* antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 658-860 (1989).
59. Chernesky MA, H. Lee, Schachter J, Burczak. JD, Stamm WE, McCormack WM, Quinn TC: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* urethral infection in symptomatic and asymptomatic men by testing first-void urine in a ligase chain reaction assay. J. infect. Dis. 170: 1308-1311 (1994).

60. Lee HH, Chernesky MA, Schachter J, Burczak JD, WW Andrews, Muldoon S, Leckie G, Stamm WE: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet*. 345: 213-216 (1995).
61. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L: Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in Mc Coy cell cultures with fluorescein conjugated monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 17: 666-668 (1983).
62. Ripa KT, Mardh PA: Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide treated McCoy cells. *J. Clin. Microbiol.* 6: 328-331 (1977).
63. Stephens RS, C-C Kuo, MR Tam: Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 16: 4-7 (1982).
64. Yoder BL, WE Stamm, CM Koester, ER Alexander: Microtest procedure for isolation of *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.* 13:1036-1039 (1981).
65. Kuo CC, SP Wang, BB Wentworth, JT Grayston: Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE - Dextran. *J. Infect. Dis.* 125 :665-668 (1972).
66. Kretch T, M Bleckmann, R Paatz: Comparison of Buffalo Green Monkey cells and Mc Coy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* in a microtiter system. *J. Clin. Microbiol.* 27; 2364-2365 (1989).
67. Ustaçelebi Ş: *Chlamydia* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı."Chlamydia İnfeksiyonları ve Tanıda Yenilikler"(Ed: Anğ Ö, Badur S, Ağaçfidan A). Türk

Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:20 İ.Ü. Basımevi ve film merkezi İstanbul (1994).

68. Tam MR, StammWE, Handsfield HH, Stephens R, Kuo C-C, Holmes KK, Ditzenberger K, Crieger M, Nowinski RC: Culture Independent Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. N. Engl. J. Med. 310: 1146-1150 (1984).
69. Jones MF, Smith TF, Houglum AJ, Hermann JE: Detection of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens by the Chlamydiazyme test. J. Clin. Microbiol. 20: 465-467 (1984).
70. Roblin PM, Gelling M, Kutlin A, Tsumura N, Hammerschlag MR: Evaluation of a new optical immunoassay for diagnosis of neonatal chlamydia conjunctivitis. J. Clin. Microbiol. 35: 516-517 (1997).
71. Bailey RL, Arullendran P, Whittle HC, Mabey DCW: Randomized controlled trial of single dose azithromycin in the treatment of trachoma. Lancet. 342: 453 (1993).
72. Workowsky KA, Lampe MF, WongKG, Watts MB, Stamm WE: Long term eradication of *Chlamydia trachomatis* infection after antimicrobial therapy. JAMA 270:2071 (1993).
73. Krohn K: Gynecological tissue levels of azithromycin. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10:859 (1991).
74. Weber JT, Johnson RE: New treatments for *Chlamydia trachomatis* genital infection. Clin. Infect. Dis. 20 (suppl 1): 66-71 (1995)

75. Orr P, Sherman E, Blanchard J, Fast M, Hammond G, Brunham R :
Epidemiology of infection due to *Chlamydia trachomatis* in Manitoba, Canada.
Clin. Infect. Dis. 19: 876-883 (1994).
76. Magder LS, Klontz KC, Bush LH, Barnes RC: Effect of patient characteristics
on performance of an enzyme immunoassay for detecting cervical *Chlamydia
trachomatis* infection. J. Clin. Microbiol. 28: 781-784 (1990).
77. Quinn TC, Warfield P, Kappus E, Barbacci M, Spence M: Screening for
C.trachomatis infection in an inner-city population: A comparison of diagnostic
methods. J. Infect. Dis. 152: 419-423 (1985).
78. Dereli D, Ertem E, Serter D, Tavmergen E, Tavmergen E, Çapanoğlu R:
İnfertil kadınlarda Direkt floresan antikor ve enzim immunoassay yöntemleri ile
Chlamydia trachomatis insidansı: Yöntemlerin karşılaştırılması. Türk.
Mikrobiyol. Cem. Derg. 23:110-112 (1993).
79. Cles LD, Bruch K, Stamm WE: Staining characteristics of commercially
available monoclonal immunofluorescence reagents for diagnosis of *Chlamydia
trachomatis* infections. J. Clin. Microbiol. 26:1735-1737 (1988).
80. Quinn TC, Gupta PK, Burkman RT, Kappus EW, Barbacci M, Spence MR:
Detection of *Chlamydia trachomatis* cervical infection: A comparison of
Papanicolaou and immunofluorescent staining with cell culture. Am. J. Obstet.
Gynecol. 157: 394-399 (1987).
81. Suchland KL, Counts JM, Stamm WE: Laboratory methods for detection of
Chlamydia trachomatis in Washington state. J. Clin. Microbiol. 35: 3210-3214
(1997).

82. Stamm WE: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infections. Ann. Intern. Med. 108: 710-717 (1988).
83. Bladding J, Hirsch L, Stranton N, Wright T, Aarnaes S, Maza LM, Peterson EM: Comparison of the Clearview Chlamydia, the PACE 2 assay, and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens in a low - prevalence population. J. Clin. Microbiol. 31: 1622-1625 (1993).
84. Kluytmans JAJW, Goessens WHF, Mouton JW, Rijsoort-Vos JH, Niesters HGM, Quint WGV, et al: Evaluation of Clearview and Magic Lite tests, polymerase chain reaction, and cell culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J. Clin. Microbiol. 31: 3204- 3210 (1993).
85. Kellog JA, Seiple JW, Hick ME: Cross-reaction of clinical isolates of bacteria and yeasts with the chlamydiazyme test for chlamydial antigen, before and after use of a blocking agent. Am. J. Clin. Pathol. 97: 309-312 (1992).

Ek 1:

HASTA FORMU

Örneğin alındığı tarih :

Örnek sıra no :

Hastanın :

Adı Soyadı:

Yaşı :

Cinsiyeti :

Şikayeti :

Kullandığı antibiyotikler :

Mesleği :

Klinik bulgular :

Test Sonuçları :

| | |
|---------------|--|
| DFA | |
| EIA | |
| Hücre kültürü | |

AÇIKLAMALAR :