

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
CHLAMYDIA TRACHOMATIS ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Osman ÖZÜBERK**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE
CHLAMYDIA TRACHOMATIS ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Osman ÖZÜBERK**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından TSY-09-707 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Ocak 2011
KAYSERİ**

Prof.Dr.Selma GÖKAHMETOĞLU Danışmanlığında **Osman ÖZÜBERK** tarafından hazırlanan “**Klinik Örneklerde Çeşitli Yöntemlerle *Chlamydia trachomatis* Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2010

JÜRİ

İmza

Üye : Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU

Üye : Prof. Dr. A.Nedret KOÇ

Üye : Prof. Dr. İzzet ŞAHİN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarında beni yönlendiren ve emeği geçen diğer bütün Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Hasta örneklerini toplamada yardımcı olan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Bülent ÖZÇELİK ve Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ hocama teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim sırasında ve tez dönemimde yanımda olan aileme ve beni bu dönemde manevi desteğinden mahrum bırakmayan arkadaşım Yusuf SAKUT'a teşekkür ederim.

Tezimi çalışmamda her türlü desteği benden esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarından Uzm. Biyolog Nurhan AKGÜN, Uzm. Biyolog Zahide AKKAYA, Biyolog Gülşah DURAN, Biyolog Ela BAŞOK, Uzm. Biyolog Aslıhan GÜLTEKİN, Uzm. Biyolog Filiz TEKİNŞEN, Biyolog Nurgül BALCI ve arkadaşım Uzm. Biyolog Mehmet ÖLÇÜ'ye teşekkür ederim.

KLİNİK ÖRNEKLERDE ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Chlamydia trachomatis, tüm dünyada en yaygın seksüel geçişli bakteriyel enfeksiyon ajanı olarak bilinir. Bu mikroorganizma zorunlu hücre içi parazitidir. *C. trachomatis*, trahom gibi göz enfeksiyonlarına, yenidoğanlarda pnömonilere, genitoüriner sistem (GÜS) enfeksiyonlarına ve Lenfo Granüloma Venorum (LGV) suşları tarafından oluşturulan ve özellikle genital bölgedeki lenf düğümlerinde patoloji oluşturan LGV'a neden olmaktadır. Bu nedenle *C. trachomatis* enfeksiyonlarının hızlı ve güvenilir laboratuvar tanısı erken tedavi açısından önemlidir. Bu çalışmada klinik örneklerde Direk Floresan Antikor (DFA), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve hücre kültürü yöntemleri ile *C. trachomatis*'in araştırılması amaçlandı.

Şubat 2010-Mart 2010 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum poliklinikleri ile Üroloji polikliniklerine genital akıntı ön tanısıyla başvuran ve genital enfeksiyon düşünülen 50 hastadan alınan sürüntü örnekleri çalışmaya dahil edildi. Sürüntü örneklerinden *C. trachomatis* antijeni DFA (PathoDx, Remel, Amerika) yöntemiyle araştırıldı. *C. trachomatis* izolasyonunda McCoy hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültüründe *C. trachomatis*'in üreyip üremediği DFA (PathoDx, Remel, Amerika) ve iyot boyama yöntemleri ile doğrulandı. Bütün örneklerden *C. trachomatis*-DNA belirlenmesi için PCR yöntemi (Sacace, İtalya) uygulandı. Hücre kültürü "altın standart" kabul edilip DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı.

Çalışmaya alınan 50 sürüntü örneğinin 4'ünde (%8) DFA ile *C. trachomatis* antijeni pozitif bulundu. McCoy hücre kültürüne ekimi yapılan 50 sürüntü örneğin 1'inde (%2) DFA ve iyot boyama yöntemleriyle üreme olduğu gösterildi. 50 sürüntü örneğin 1'inde (%2) *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu. Hücre kültüründe üreme görülen örnekte PCR ve DFA yöntemleriyle de *C. trachomatis* pozitif bulundu. Sadece DFA yöntemi ile pozitif bulunan 3 sürüntü örneğindeki pozitiflik yalancı pozitiflik olarak yorumlandı. DFA yöntemin duyarlılığı %100, özgüllüğü %94, PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bulundu.

DFA yöntemi ve PCR yöntemi hücre kültürü yöntemine kıyasla çabuk sonuç veren, hızlı tanı metodlarıdır. DFA yönteminde yalancı pozitiflikler görülebileceği için, sürüntü örneklerinde *C. trachomatis* daha duyarlı bir metod olan PCR ile araştırılabilir.

Anahtar kelimeler: *C. trachomatis*, DFA, PCR, hücre kültürü.

THE INVESTIGATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN CLINICAL SAMPLES WITH VARIOUS METHODS

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is known as the most common bacterial infection agent that passes with sexual transition. This microorganism is an obligatory intracellular parasite. *C. trachomatis* causes eye infections such as trachoma, pneumonias in new born babies, genito urinary system infections (GUS) and LGV (Lymphoid Granule Venorum) that is constituted by LGV strains causes pathology in the lymph nodes in the genital region. For this reason; the fast and reliable laboratory diagnosis of *C. trachomatis* infections is important in terms of early treatment. In this study, it has been aimed to investigate the *C. trachomatis* by using Direct Fluorescent Antichor (DFA), polymerase chain reaction (PCR) and cell culture methods.

The swab samples that have been taken from 50 patients, who have applied to Erciyes University Gevher Nesibe Investigation and Application Hospital Obstetric and Gynecology Policlinics and Urology Policlinics with genital flow pre-diagnosis between February 2010 and March 2010 dates, have been included in this study. *C. trachomatis* antigens were investigated by DFA (PathoDx, Remel, USA) method. McCoy cell culture was used for isolation of *C. trachomatis* in there swab samples. Growing of *C. trachomatis* in the cell culture was confirmed by DFA (PathoDx, Remel, USA) and Iodine method. *C. trachomatis* DNA was investigated by PCR (Sacace, Italy) in the samples. Specificitys and sensitivitys of PCR and DFA methods were calculated considering cell culture as the gold standart.

C. trachomatis antigen was found positive by DFA in 4 (8%) of 50 swab samples that has been included in the study. *C. trachomatis* isolation in McCoy cell culture was shown by DFA and Iodine method in 1 (2%) of 50 samples. *C. trachomatis* DNA was found positive in 1 (2%) sample of 50 samples. *C. trachomatis* DNA was found positive by PCR and DFA methods in the samples that *C. trachomatis* was isolated in the cell culture. *C. trachomatis* was found positive only by DFA method in 3 samples and this positivity was considered as false positivity of DFA method. The sensitivity and specificity were found as %100 and %94 respectively for DFA and %100, %100 respectively for PCR.

DFA and PCR methods are rapid diagnosis methods that result more quickly than cell culture methods. As false positive results can be obtained by DFA in swab samples, *C. trachomatis* can be investigated in these samples by PCR that is more sensitive than DFA.

Keywords: *C. trachomatis*, DFA, PCR, cell culture.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT... ..	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	X
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.TARİHÇE	3
2.2.SINIFLANDIRMA	4
2.3.GENEL ÖZELLİKLER VE MORFOLOJİK YAPI	8
2.3.1.Elementer Cisimcik (EC)	8
2.3.2.Retiküler (inisiyal) Cisimcik (RC)	9
2.3.3.Ara (intermediate) Cisimcik (AC)	9
2.4. <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> 'İN ÜREME SİKLUSU	9
2.5. ANTİJENİK YAPI	11
2.6. BOYANMA ÖZELLİKLERİ	11
2.7. FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKİLERE DİRENÇ	12
2.8. PATOLOJİ VE PATOGENEZ	12
2.9. KLİNİK ÖZELLİKLERİ	13
2.9.1. Klasik Oküler Trahom	13
2.9.2. LGV	13
2.9.3. Yetişkinlerde Diğer Okülogenital Hastalılar	14
2.9.4. Yenidoğan Enfeksiyonları	15
2.10. LABORATUVAR TANI	16
2.10.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	16

2.10.2. Mikroskopi ile Direkt İnceleme	17
2.10.3. Hücre Kültürü	17
2.10.4. Antijen Tayini	18
2.10.5. Serolojik Yöntemler	19
2.10.6. Moleküler Tanı Yöntemleri	19
2.10.6.1. Nükleik Asit Hibridizasyonu (NAH)	19
2.10.6.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri (NAAT)	19
2.10.6.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)	19
2.10.6.2.2. Ligase Chain Reaction (LCR)	20
2.10.6.2.3. Transcription Mediated Amplification (TMA)	20
2.10.6.2.4. Strand Displacement Amplification (SDA)	20
2.10.6.2.5. Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	21
2.11. EPİDEMİYOLOJİ	21
2.12. KORUNMA	23
2.13. TEDAVİ	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. ÖRNEKLER	25
3.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DİREKT <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI	26
3.3. <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> DNA'SININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI	27
3.4. <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> 'İN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU	30
4. BULGULAR	35
4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DFA BULGULARI	36
4.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI	37
4.3. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI	39
4.4. DFA, PCR VE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	
EKLER	

KISALTMALAR

AC	: Ara Cisimcik
ADP	: Adenozine diphosphate
ATP	: Adenozine triphosphate
BHK-21	: Bebek hamster böbrek hücre kültürü
Bp	: Base pair
CDC	: Center Diseases Control
cm	: Cantimetre
CYBH	: Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar
DFA	: Direkt Immunofloresan Antikor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EB	: Elementer Body
EC	: Elementer Cisimcik
EIA	: Enzyme immunoassay
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
gr	: Gram
GÜS	: Genitoüriner sistem
Hep-2	: Larinks epitelyal karsinoma hücre kültürü
Hela 229	: İnsan serviks karsinoma hücre kültürü
HSP 60	: Heat Shock Protein 60
IgA	: Immunoglobilin A
IgG	: Immunoglobilin G
IgM	: Immonoglobilin M
Kbp	: Kilobase pair
kD	: kiloDalton
LAP	: Lenfadenopati
LCR	: Ligase Chain Reaction
LGV	: Lenfoganüloma venerum
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
McCoy	: Fare fibroblastı ile kontamine olmuş insan sinoviyal hücrelerinden üretilen hücre kültürü

MEM	: Minimum Essential Medium
mg	: Miligram
MIF	: Mikro immünoassay
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MOMP	: Major Outer Membrane Protein (Dış membran proteini)
mRNA	: Messenger RNA
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri
NAH	: Nükleik Asit Hibridizasyonu
nm	: Nanometre
OIA	: Optik immunoassay
OMP 1	: Outer Membrane Protein 1
PBS	: Phosphat Buffer Solution
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Potansiyel Hidrojen
RC	: Retiküler Cisimcik
Re A	: Reaktif Artrit
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Rotation per minute
RT-PCR	: Real Time- PCR
SDA	: Strand Displacement Amplification
2SP	: Sucrose Phosphate buffer
TBE	: Tris-Borate-Edta
TMA	: Transcription Mediated Amplification
UV	: Ultraviyole

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. <i>Chlamydia</i> türlerinin özellikleri	7
Tablo 2.2 <i>C.trachomatis</i> biyovar ve serovarların yaptıkları hastalıklar	7
Tablo 4.1. Alınan örneklerin polikliniklere göre dağılımı.....	36
Tablo 4.2. Sürüntü örneklerinde DFA bulguları	36
Tablo 4.3. Sürüntü örneklerinde hücre kültürü bulguları	39
Tablo 4.4. Sürüntü örneklerinde PCR bulguları	40
Tablo 4.5. Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması	41
Tablo 4.6. DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri.....	41
Şekil 2.1. Klamidyaların sınıflandırılması	6
Şekil 2.2. Klamidyaların üreme siklusu	10
Şekil 4.1. DFA yöntemi ile <i>C. trachomatis</i> antijeninin gösterilmesi	36
Şekil 4.2. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 24 saat sonraki görüntü.....	37
Şekil 4.3. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 48 saat sonraki görüntü.....	37
Şekil 4.4. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 72 saat sonraki görüntü.....	38
Şekil 4.5. McCoy hücre kültüründe DFA yöntemiyle <i>C. trachomatis</i> antijenin gösterilmesi	38
Şekil 4.6. McCoy hücre kültüründe iyot boyama yöntemiyle <i>C. trachomatis</i> inklüzyonun gösterilmesi.....	39
Şekil 4.7. Jel elektroforez sisteminde <i>C. trachomatis</i> -DNA incelenmesi	40

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Chlamydia trachomatis, tüm dünyada en yaygın seksüel geçişli bakteriyel enfeksiyon ajanı olarak bilinir (1). Bu mikroorganizma zorunlu hücre içi parazitidir (2). *C.trachomatis*, trahom gibi göz enfeksiyonlarına, yenidoğanlarda pnömonilere, genitoüriner sistem (GÜS) enfeksiyonlarına ve Lenfo Granüloma Venerum (LGV) suşları tarafından oluşturulan ve özellikle genital bölgedeki lenf düğümlerinde patoloji oluşturan LGV'a neden olmaktadır. Son yıllarda *C.trachomatis* tarafından oluşturulan enfeksiyonlara yenileri eklenmiş olup bunlardan en önemlisi reaktif artrittir (3).

C.trachomatis enfeksiyonları dikkate alındığında özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada ciddi bir sağlık ve korunma sorunu oluşturduğu ve bu enfeksiyonların tanısının zor olmasının da tedavide gecikmeye neden olduğu, bununla bağlantılı olarak da meydana gelen enfeksiyonların ağır bir seyir izleyerek yüksek mortaliteye yol açtığı ortaya çıkmaktadır (4,5).

Chlamydia trachomatis 15 serotipe ayrılır; A, B, B_a ve C tipleri, D'den K'ya kadar olan tipleri, L₁, L₂ ve L₃ tipleridir (6). A, B, B_a ve C tipleri; konjunktival ve korneal skarlaşmayla körlüğe yol açabilen kronik keratokonjunktivite (trahom) sebep olur, genellikle ikinci bir bakteriyel enfeksiyonla birlikte bulunur, neonatal pnömoniye yol açabilir. D'den K'ya kadar olan tipleri, erkeklerde gonokokal olmayan üretrite;

kadınlarda üretrit, servisit, salpenjit ve pelvik enflamatuvar hastalığa; enfekte doğum kanalından geçen bebeklerde kendiliğinden geçen inklüzyon konjunktivitine ve neonatal pnömoniye sebep olabilir. L₁, L₂ ve L₃ tipleri; süpüratif inguinal adenitle karakterize LGV adı verilen ve cinsel yolla bulaşan bir hastalığa yol açar (7).

Chlamydia trachomatis'in kesin tanısı, kültür ve izolasyon, antijen ve antikorların araştırıldığı yöntemler (doğrudan floresans tekniği ve enzimli immün deneyler), hibridizasyonu veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) esasına dayanan testlerle yapılmaktadır (6). Ayrıca klinik örnek preparatları %5'lik iyot eriyiğiyle veya Giemsa yöntemiyle boyanarak hücre içi inklüzyon cisimcikleri araştırılabilir (8).

C.trachomatis enfeksiyonlarının hızlı ve doğru laboratuvar tanısı; *C.trachomatis* bakterisinin ürogenital sisteme yerleşen diğer bakterilerden ayrımında ve *C.trachomatis* enfeksiyonlarının antibiyotiklerle tedaviye başlanmasında önemlidir (8).

Bu çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden hücre kültürü, PCR ve direk floresan antikor (DFA) yöntemleri uygulanarak *C.trachomatis*'in araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TARİHÇE

Chlamydia'lara ait ilk veriler antik çağlara kadar uzanmaktadır. Milattan önce 27.yüzyılda Çin'de, milattan önce 25.yüzyılda Sümer'de, 19.yüzyılda Mısır'da trahomdan bahseden (Ebers) yazıtlara ulaşılmıştır. Orta Asya'dan Avrupa'ya savaşlarla yayılan hastalık antibiyotiklerin kullanımı arttıkça dünyada giderek azalmıştır (9,10). *Chlamydia*'ların 20.yüzyılın başlarına kadar genital enfeksiyonlardaki rolü anlaşılamamıştır. İlk kez Halberstaedter ve Von Prowazek 1907 yılında trahomlu hastaların konjunktival kazıntılarından elde ettikleri örnekleri Giemsa ile boyamışlar ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerini göstermişler, bunun bir protozoon olduğunu düşünerek *Chlamydiazoae* adını vermişlerdir. Bu isim Yunanca "chlamys" sözcüğünden gelmekte olup çevreyi örten bir perdeyi tanımlamakta ve hücre nükleusunun çevresini kaplayan inklüzyonları ifade etmektedir (11).

Lindner 1911'de ürogenital sisteminde *Chlamydia* enfeksiyonu olan anneden doğan bebeğin konjunktivasında intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerini göstermesi ile *Chlamydia* ve genitooküler enfeksiyonlar arasında ilişki olduğu anlaşılmıştır (12,13). LGV ilk kez 1913 yılında Durand, Nicolas ve Favre tarafından bildirilmiştir. Frei 1925 yılında geliştirdiği deri testi ile LGV'yi sifilisten ayırt etmiştir (11,14).

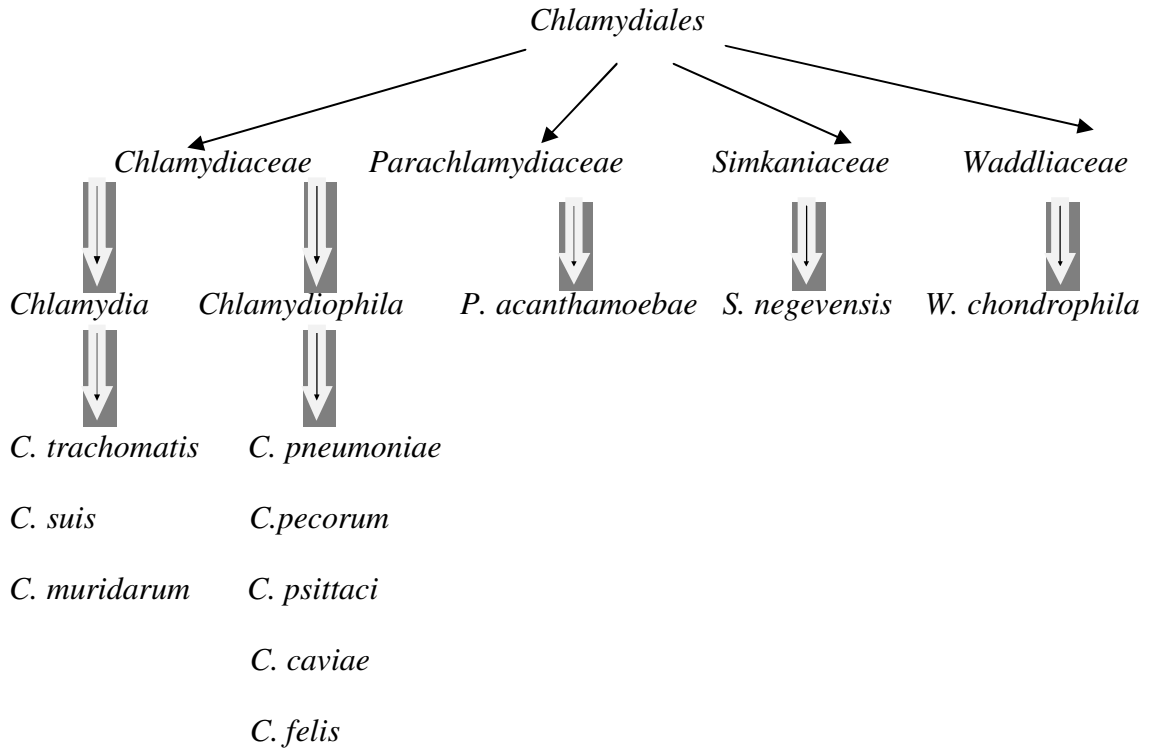
Ritter 1879 yılında İsviçre’de çıkan bir salgın üzerinde çalışırken bu enfeksiyona pnömotifüs adını vermiştir. Morange 1892 yılında hasta papağanlarla ilgili yaptığı çalışmadan sonra psittakoz terimini kullanmıştır (Psittakoz Yunancada papağan anlamına gelir). İngiltere’de Bedson, ABD’de Kromwede ve Almanya’da Levinthal tarafından 1930 yılında bu organizma tanımlanmıştır. Meyer ve Eddie 1942’de ornitoz (ornithosis) terimini güvercin ile temastan sonra gelişen enfeksiyon için, psittakoz (psittacosis) terimini de “psittacene” kuşlarından gelen enfeksiyonlar için kullanılmasını önermişlerdir. Psittakoz etkeni Burnet ve Rountree tarafından 1935 yılında döletli tavuk yumurtasında, Yanamura ve Meyer tarafından 1941 yılında hücre kültüründe üretilmiştir (11,14,15).

Chlamydia pneumoniae ilk defa, 1965 yılında Tayvan’da trahom aşı çalışmasına katılan bir çocuğun konjunktival sürüntüsünden izole edilmiş ve TW-183 olarak isimlendirilmiştir. Amerika’da 1983’de farenjitli çocukların boğaz kültürlerinden izole edilen başka bir klamidya türü de AR-39 olarak adlandırılmıştır. TWAR ismi (TW+AR) ilk konjunktival suş ile solunum suşundan gelmektedir. Hücre kültürünün 1970’li yıllarda yapılmaya başlaması ile TW-183 olarak bilinen Tayvan izolatının konak hücrelerinde inklüzyon cisimleri oluşturduğu görülmüştür. Bu inklüzyonlar *C. psittaci* ve *C. trachomatis*’e benzetilmişler, fakat *C. trachomatis*’in aksine iyot ile boyanmadığından bu izolatın *C. psittaci*’nin bir türü olduğu tahmin edilmiştir. TWAR suşunun 1989 yılında elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik çalışmalar ve DNA dizi analizinde farklı bir suş olan *C.pneumoniae* tanımlanmıştır (11,16).

2.2.SINIFLANDIRMA

Enerji bağımlısı oldukları için hücre içinde yaşamak zorunda olan *Chlamydiae*’lerin, yıllarca virüs mü bakteri mi olduğu tartışma konusu olmuştur (15). Mecburi hücre içi parazitleri olmaları sebebi ile uzun süre büyük virüsler olarak kabul edilen *Chlamydia*’lar Stainer ve Wolf’un 1917 yılında virüsler ile bakteriler arasındaki farklılıkları ortaya koymalarından sonra, *Chlamydia*’ların hem DNA hem RNA’larının bulunması, ribozomlarının olması, ortadan ikiye bölünerek çoğalmaları ve antibiyotiklere duyarlılıkları dikkate alınarak bunlar Gram negatif bakterilere yakın bir grup olarak bakteriler içerisinde sınıflandırılmışlardır (12,17).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin birinci cildinde 1984 yılında *Chlamydiales* takımı oluşturulmuştur. Bu takımın tek ailesi olarak *Chlamydiaceae*'nin, tek cins olarak *Chlamydia*'nın ve bu cins içerisinde de *C. trachomatis* ile *C. psittaci* şeklinde adlandırılan iki türün varlığı kabul edilmiştir (15,18). TWAR suşunun 1989 yılında elektron mikroskobu ile yapılan morfolojik çalışmaları ve DNA diziliminin analizi ile klamidyanın farklı bir suşu olan *C. pneumoniae* tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalarda *Chlamydiae* sınıfına bağlı *Chlamydiales* takımında dört farklı ailenin bulunduğu, bunların da değişik cins ve türlerden oluştuğu ileri sürülmüştür. Günümüzde 16S ve 23S rRNA dizi analizleri sonucunda yeni bir sınıflandırma ortaya atılmıştır. Bu sınıflandırma ile *Chlamydiales* takımı, *Chlamydia* ve *Chlamydiophila* olarak 2 ayrı cinse ayrılmıştır. Klamidyalar antijenik yapılarına, intrasellüler inklüzyonlarına, sulfonamidlere duyarlılıklarına ve yaptıkları hastalıklara göre *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* ve *Chlamydia pneumoniae* olmak üzere üç patojen tür altında toplanmaktadır. Ayrıca patojen olmayan dördüncü tür *Chlamydia pecorum* vardır (Şekil 2.1) (9,14).



Şekil 2.1. Klamidyaların sınıflandırılması

C. trachomatis cinsel yolla bulaşan bir patojen ve oküler trahomun sebebi olarak bilinmektedir. *C. trachomatis*'in insan için patojen olan üç biyovarı vardır. Bunlar;

C.trachomatis biyovar *trachoma*, *C.trachomatis* biyovar *lymphogranuloma venereum* (LGV) ve *C.trachomatis* biyovar *mouse pneumonitis*'dir. *C.trachomatis*'in *C.trachomatis* biyovar *trachoma*, *C.trachomatis* biyovar *lymphogranuloma venereum* biyovarlarının 18 tane serovarı vardır. Bu sınıflandırma mikroimmünofluoresan yöntemi ile antijenik çapraz reaksiyona göre yapılmaktadır. Bu 18 serovarin, 4 serovarı LGV ile ilgili olan L1, L2, L2a ve L3'dür. Trahom biyovarının 14 serovarı vardır ve okülojenital hastalıklardan sorumludur. A, B, Ba ve C trahom, D-K, Da ve Ia ise inklüzyonlu konjunktivit ve genital enfeksiyon etkenidir. Bazen B ve Ba serovarı da genital sistemden izole edilirken, A ve C serovarı izole edilmemiştir (Tablo 2.1 Klamidya türlerinin özellikleri). Bu biyovarlar monoklonal antikorların tiplendirilmesi ve genomik DNA dizi analizine göre tanımlanmıştır. Daha sonra antijenik olarak farklı dış membran proteini (MOMP) kodlayan OMP1 geninin nükleotid dizilimi ve PCR ile minör varyantlar tanımlanmıştır. Biyovar ve serovarların yaptıkları hastalıklar da farklıdır (Tablo 2.2) (19).

Tablo 2.1. *Chlamydia* türlerinin özellikleri (14).

Özellikler	<i>C.trachomatis</i>	<i>C.psittaci</i>	<i>C.pneumoniae</i>
Doğal konakçı	İnsanlar	Kuşlar,aşağı memeliler	İnsanlar
Bulaşma yolu	İnsandan-insana (seksüel)	Hava yoluyla	Hava yoluyla
Hedef hücreler	Konjunktival ve genital epiteller, makrofajlar	Solunum yolu Epitelleri	Solunum yolu epitelleri
G+G %	42-45	39-43	40
Lipolisakkarit	+	+	+
Peptidoglikan	-	-	-
Antijenik proteinler, kD	40, 60, 68	40, 60, 68	40, 60, 68, 98
İnklüzyonda glikojen	+	-	-
Plazmid	+	+	-
Serovar	-LGV -Trachoma -Fare pnömonisi	?	TWAR
EB morfolojisi	Yuvarlak	Yuvarlak	Armut şeklinde
Sulfonamid duyarlılığı	+	-	-
Önemli klinik patolojiler	Trahom, LGV, okülojenital hastalıklar	Pnömoni, nedeni bilinmeyen ateş	Pnömoni, Bronşit

Tablo 2.2. *C.trachomatis* biyovar ve serovarların yaptıkları hastalıklar (10).

Biyovar	Serovar	Hastalık
<i>C.trachomatis</i> biyovar <i>trachoma</i>	A, B, Ba, C	Trahom
	D-K, B, Ba, Da ve Ia	Yetişkin ve çocukta okülojenital hastalıklar ve yenidoğan pnömonisi
<i>C.trachomatis</i> biyovar <i>lymphogranuloma venereum</i>	L1, L2, L2a, L3	LGV

2.3.GENEL ÖZELLİKLER VE MORFOLOJİK YAPI

Klamidyalar; üreme evrimi diğer bakterilerden farklı olan zorunlu hücre içi parazitidirler. Önceleri *Bedsonia* olarak da anılan Klamidyalar Hem DNA ve hem de RNA içermeleri, bölünerek çoğalmaları, Gram negatif bakterilere benzer sert bir hücre duvarına sahip olmaları, ribozom ve metabolik aktivite sağlayan çeşitli enzimlerinin bulunması ve antibiyotiklere duyarlı olmaları nedeniyle bakteriler arasında yer almaktadır. Klamidyalar, enfekte ettikleri hücrelerde interferon oluştururlar (14). Klamidyalar, kendi metabolik yetileri ile enerji oluşturmazlar, bu nedenle konak hücrenin enerji kaynaklarından yararlanan enerji paraziti bakterilerdir (15). Yaşam siklusları dimorfik olması nedeniyle üç şekilde bulunabilirler.

2.3.1.Elementer Cisimcik (EC)

Chlamydia cinsi bakteriler, enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmalarında inklüzyon oluşturarak ürerler. Hücre dışı enfekte form olan EC duyarlı konak hücreye yapışır. Bu yapışmadan reseptörlerin mi yoksa bakteri yüzey proteinlerinin mi sorumlu olduğu tam olarak açıklanamamaktadır (20). Klamidyaların enfeksiyondan sorumlu formu elementer cisimciktir. Hücre dışında bir süre canlı kalabilmelerine rağmen replike olamazlar. Küçük, yuvarlak, 150-350nm çapında, elektron yoğun cisimcikler olup ortalarında bir çekirdekleri vardır. Ribozomları ve çevresi üç tabakalı bir çeperle çevrilmiş sitoplazmalı yapılardır. Morfolojik olarak *C.trachomatis* ve *C.psittaci*'nin EC'leri yuvarlak, *C.pneumoniae*'ninkiler ise armut şeklindedir (21). EC'lerde, RNA ve DNA oranı birbirine eşittir. Yüzeylerinde hemagglütinin vardır. Metabolik aktiviteleri çok düşüktür. Yalnızca bazı kofaktörlerin yardımıyla sınırlı enzimatik aktiviteleri ile glikozu katabolize edebilirler ve son ürün karbondioksit olana kadar ayrıştırabilirler. Sadece bazı lipitleri sentezleyebilirler. EC, rölatif olarak sonikasyon ve tripsine dirençli olup geçirgen değildir. Peptidoglikan tabakası içermemesine rağmen, disülfid bağları ile birleşmiş MOMP sayesinde dış etkilere karşı dirençlidir. Hücre duvarı, başlıca bir çeşit proteinden oluşması, peptidoglikan içermemesi ve periplazmik aralığının bulunmamasıyla Gram negatif bakterilerden farklılık gösterir (11,15,22).

2.3.2.Retiküler (inisiyal) Cisimcik (RC)

Klamidyaların hücre içine girdikten sonra oluşturdıkları formdur. Bu cisimcikler ince çeperli ve yuvarlaktırlar. Ortalama 800-1500nm çapında, içinde nükleer fibriller ve ribozomlar bulunan cisimciklerdir. RNA içeriği DNA içeriğinden 3-4 kat fazladır. Bunlar elektronlara karşı daha az yoğundur. Hemaglutinin içermezler. Hücre duvarı, lipopolisakkarit (LPS) ağırlıklıdır. Rölatif olarak sonikasyon ve tripsine duyarlı ve EC'den daha geçirgendir. Metabolik olarak çok aktif olmalarına karşın ATP sentezleyemezler, ATP/ADP transport sistemi ile konakçı hücreden enerji gereksinimini karşılarlar. Nükleik asit ön maddelerini konakçı hücreden sağlamak koşulu ile kendi enzimlerini kullanarak DNA ve RNA moleküllerini sentezleyebilirler (11,15,16,22).

2.3.3.Ara (intermediate) Cisimcik (AC)

EC ve RC arasında gelişme esnasında oluşan ara karakterdeki cisimciklerdir.

2.4. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*'İN ÜREME SIKLUSU

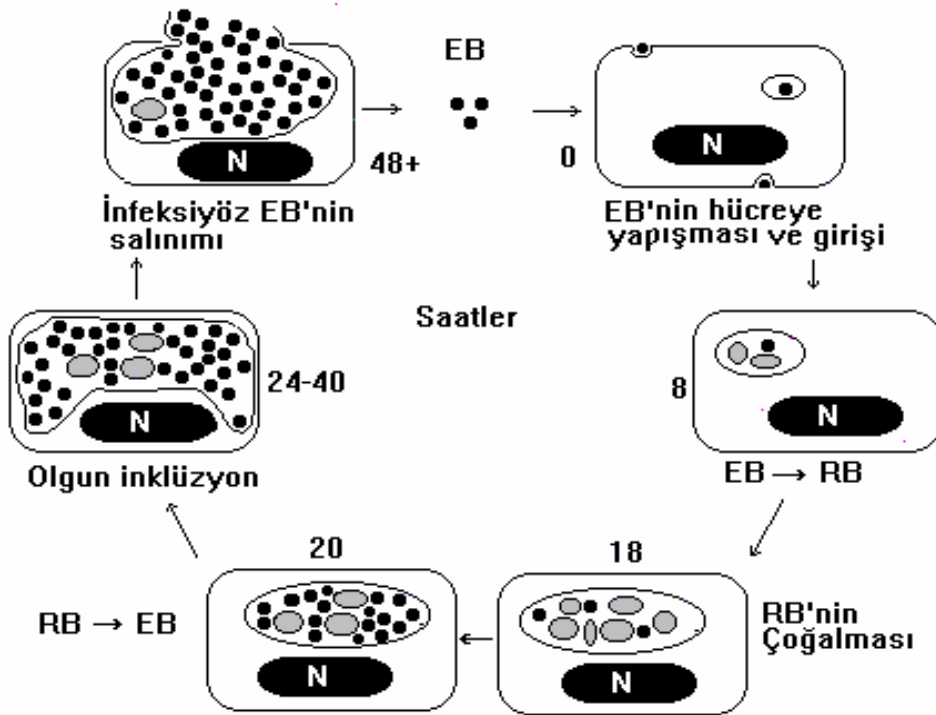
Chlamydia cinsi bakteriler, enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmalarında inklüzyon oluşturarak ürerler (20). Klamidyal enfeksiyon döngüsü, elementer cisimin konak hücre yüzeyine yapışması ile başlar (23). EC'ler konak hücreye bağlanırlar ve konak hücre tarafından fagosite edilmeleriyle de (endositoz) üreme siklusu başlar. Konak hücreye bağlanmada, konakçı hücre reseptörleri, EC'nin hemaglutinin antijeni ve elektrostatik güçler sorumlu tutulmaktadır. Prostaglandinlerin de hücre içi guanozin düzeyini arttırıp, membran akışkanlığını değiştirerek, endositozu başlattıkları ileri sürülmektedir (11).

EC'lerin fagositoz olayında aktif olarak rol aldıkları düşünülmektedir. Fagositoz yeteneği olmayan hücrelerin de bunu gerçekleştirmeleri buna delil olarak gösterilmektedir. Isı ve UV ile inaktive edilmiş EC'ler de fagositozu başlatabilirler (16). EC fagosite edildikten sonra etrafında, konak hücre membranından meydana gelen bir sitoplazmik vakuol oluşturulur. EC'ler, henüz bilinmeyen bir mekanizma ile fagozom-lizozom birleşmesini önleyerek (inaktif veya antikorla kaplı değillerse) lizozomal hidrolazların etkisinden kurtulurlar. Bu sırada, enfektivitesini kaybeden EC, RC'ye dönüşüm ile ilgili morfolojik ve moleküler değişimler yaşar. Enfeksiyonun 6-8. saatlerinde vakuol içerisinde EC'de RC'ye dönüşüm tamamlanır ve daha sonra RC, ikiye bölünerek çoğalma aşamasını başlatır. Sekiz ile onikinci saatlerde vakuol içerisinde yaklaşık 4-16 adet RC bulunur. Bölünme enfeksiyonun 18-24. saatlerine

kadar devam eder. Bu arada, cisimciklerin sayılarının artması ve boyutlarının küçülmesine bağlı olarak vakuol büyür inklüzyon cisimciği oluşur. Bu dönemde, cisimciklerde protein-karbonhidrat komplekslerinin senteziyle ilişkili merkezi yoğunlaşma başlar. Glikojen birikmesine bağlı olarak iyodin ile boyanabilme özelliği kazanır (11).

Yoğunlaşma, 24-48. saatlerde devam ederek yeniden EC'ye dönüşüm başlar. Bu olayda temel etken, MOMP yapısındaki değişikliktir. RC'de açık halde bulunan disülfid bağları birleşir ve sisteinden zengin proteinlere bağlanarak yeniden EC'nin dayanıklı yapısı oluşur. Bu sırada ara cisimcik denilen geçiş formları da görülebilir (15). EC'ye dönüşümün tamamlanması enfeksiyonun 48-72. saatlerinde olur. Klamidyal proteinazların da etkisiyle vezikül yırtılarak 100 ya da daha fazla EC ekstrasellüler ortama salınır (Şekil 2.2) (11).

C.pneumoniae ve *C.trachomatis* türlerinin EC olarak konak hücreden salınımları, ters endositoz ile olmakta dolayısıyla konak hücre hasar görmemektedir, *C.psittaci* türünde ise konak hücre parçalanmaktadır (24).



Şekil 2.2. Klamidyal üreme siklusunu (14).

2.5. ANTİJENİK YAPI

Klamidyalarda yüzey yapısıyla ilgili birçok proteinleri vardır. Gram negatif enterik bakterilerinkine çok benzeyen, ancak ilave bir antijenik determinantı bulunan lipopolisakkarit içerirler. Bunlardan biri olan MOMP, cinse, türe, alt türe ve serotiplere özgül determinantlara sahiptir. *C. trachomatis*'in antijenlerinden MOMP'ye karşı oluşan antikorlar, *C. trachomatis*'in enfektivitesini *in vitro* olarak nötralize ederler ve mikro immünoflouresan (MIF) testindeki reaksiyonların büyük çoğunluğundan sorumludurlar (11).

Son zamanlarda MOMP geninin (OMP1) nükleotid dizilimine göre serovarlar arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu trahomun genital enfeksiyonunun moleküler epidemiyolojisinin tanımlanmasında önemlidir. İmmün dominant cins spesifik epitoplar lipopolisakkaritlerde olmakla beraber, cins reaktif epitoplar MOMP'deki 60 kD ağırlığındaki C-Reaktif Protein ve 60 kD ağırlığındaki ısı şok proteininde (heat shock protein, HSP60) gösterilmiştir. Klamidyalardaki lipopolisakkaritler diğer Gram negatif mikroorganizmalarinkine ile benzerlik gösterir. Özellikle *Salmonella typhimurium* ve *Salmonella Minnesota* ile benzerdirler. Ancak 2.4 ve 2.8 bağlarında 3-deoksi-D-manno-oktülasonik asit trisakkarit içerir (11,16).

Klamidya türlerinde antibiyotik duyarlılığı, inklüzyon morfolojisi, konak hücre seçimi farklıdır. Türe özgü antijenler, MIF yöntemiyle belirlenir. Antijenik yapılar lipopolisakkarit ve bazı dış membran proteinlerine bağlı olarak değişmektedir. Dış membran proteinleri özellikle alt türler arasında farklılıklar göstermektedir. *C. trachomatis*'in tüm suşları sülfonamitlere duyarlı iken *C. pneumoniae* ve *C. psittaci*'nin çoğu suşu dirençlidir. Klamidya genomu 660×10^6 dalton ağırlığındadır ve mikoplazma hariç diğer prokaryotlardan daha küçüktür. *C. psittaci* ve *C. trachomatis* yaklaşık 7.5 kb ağırlığında plazmid içerirler (11).

2.6. BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Klamidyalarda boyanmaları gelişme dönemlerinin özelliklerine göre değişiklikler gösterir. EC, Giemsa boyası ile morumsu renge; Macchiavello boyasıyla, maviye boyanan hücre sitoplazması ile zıt renk oluşturacak bir şekilde kırmızıya boyanırlar. Enfeksiyöz olmayan büyük RC'ler ise Giemsa ile mavi renkte görünürler. Lugol solüsyonu ile bütün inklüzyon cisimcikleri koyu kahverengi olarak görülür. Gram

boyası bu etkenlerin tanımlanmasında anlamlı değildir. Klamidyalar immünofluoresan yöntemiyle boyanınca parlak yeşil renkte görünürler (10,15).

2.7. FİZİKSEL VE KİMYASAL ETKİLERE DİRENÇ

Klamidyalara direnci, içinde bulundukları form ile yakından ilişkilidir. Hücre dışında çok dayanıksızdırlar ve ısı ile hızla inaktive olurlar; 60 °C'de 10 dakikada, 37 °C'de 48 saatte ve 0 °C'de birkaç haftada canlılıklarını kaybederler. Klamidyalar, -50 °C ve -70 °C'de saklama ile uzun yıllar canlı kalabilirler. Liyofilizasyon ile uzun süre saklanabilseler de enfektivitelerinin çoğunu kaybederler. Eter veya etanol ile 30 dakikada, %0,1'lik formalin veya %5'lik fenol ile 24 saatte inaktive olurlar. Havada kurutulan klamidyalara bir kısmı uzun süre enfektif kalabilir (11,25,26). *C.trachomatis* suşları, endojen folat sentezi yaptıkları için sulfonamidlere duyarlıdırlar. Protein sentezi inhibitörlerinden, tetrasiklin ve eritromisin klinik enfeksiyonların çoğunda etkili olmaktadır. Ayrıca flourokinolonlara, azitromisine ve sefalosporinlere de duyarlıdırlar. Bakterilerde olduğu gibi, hücre zarı mukopeptidlerinin sentezi, penisilin ve sikloserin ile önlenmektedir. Bununla birlikte, bu hücre duvarı inhibitörleri daha çok morfolojik yönden defektif şekillerin oluşmasına yol açmakta, hastalığın tedavisinde etkisiz kalmaktadır. Aminoglikozidlerin klamidyalarda üzerindeki inhibitör etkisi çok düşüktür. Klamidya hücre duvarına lizozim etkili olmamaktadır (22,26).

2.8. PATOLOJİ VE PATOGENEZ

Klamidyalar, kadınlarda prepubertede ektoserviks, vulva ve vageni; pubertede ise endoserviks, endometrium ve salpingleri döşeyen skuamöz (tek katlı silindirik) veya pseudoskuamöz (yalancı çok katlı, silindirik) epitelyum hücrelerini; erkeklerde ise distal üretradan başlayarak epididimise kadar uzanan yolu örten benzer yapıdaki hücreleri enfekte ederler. Enfeksiyon odağında ve mukozada *Chlamydia* antijenine karşı oluşan sellüler ve humoral immün cevabın yol açtığı iltihap, mukozal fragilite ve submukozada yer yer mikroabseler ve lenf nodüllerinin hiperplazisi karakteristiktir. Reenfeksiyonlardan sonra sıklıkla 3.dönem lenf follikülleri görülür. Bunların ülserasyonunu takiben gelişen granülomatöz doku obstrüksiyona yol açabilir (27).

2.9. KLİNİK ÖZELLİKLERİ

C. trachomatis enfeksiyonları dört farklı alanda incelenir.

1. Klasik oküler trahom
2. LGV
3. Yetişkinlerde diğer okülogenital hastalıklar
4. Yenidoğan enfeksiyonları (11).

2.9.1. Klasik oküler trahom

Endemik trahomun olduğu bölgelerde genellikle ilk enfeksiyon yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkmakta ve birkaç yılda persistan hal almaktadır. Kuluçka süresi yaklaşık 3-10 gündür. Başlangıç enfeksiyonunun çoğunlukla kendiliğinden iyileşmesine rağmen, genellikle ya tekrar enfeksiyon oluşmakta ya da bakteriyel konjunktivit ile süperenfeksiyon olmaktadır. İlk dönemde papiller hipertrofi ve inflamatuvar infiltrasyon ile birlikte kronik folliküler konjunktivit şeklinde ortaya çıkar. Hastalık ilerleyince konjunktivada skar oluşur ve skar korneaya yayılır. İlave olarak göz kapağının iç yüzeyi skarlaşır, kirpikler döner ve korneayı aşındırır. Ülserasyon ve görme kaybı bunun sonucu oluşur (28).

2.9.2. LGV

LGV *C. trachomatis* LGV serovarlarının neden olduğu cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Afrika, Hindistan, Güneydoğu Asya, Güney Amerika ve Karayip Adalarında endemiktir. Sporadik olarak başka yerlerde de ortaya çıkabilmektedir (11). Üç fazı vardır.

Faz 1: Genellikle deri kıvrımı ve genital mukozadaki primer lezyondur. *C. trachomatis* skuamoz epiteli enfekte etmez. Organizma küçük çatlaklar yoluyla dış genital sistemde lezyon oluşturur. Primer lezyon genellikle küçük papül veya herpetiform ülserdir. Semptom vermeyebilir veya çok az verebilir. Enfeksiyonun kazanılmasından sonraki 3-30. gün içerisinde görülür ve skarsız olarak hızla iyileşir (29).

Faz 2: Primer lezyondan sonraki 1-2 haftada ortaya çıkar. Sistemik semptom ve lenfadenopati (LAP) ile karakterizedir. Hastaların 2/3'ünde tek taraflı LAP vardır. İnguinal LAP faz 2'deki en karakteristik bulgudur ve sıklıkla tanısaldır. Lenf nodu başlangıçta eritemli ve hassastır. İnflamatuvar süreçteki aşırı periadenitin doku etrafındaki lenf noduna yayılması sonucu inflamatuvar kitle oluşur. Kitle apseleşir,

bubon oluşur. Bu fazda sistemik bulgu, ateş, baş ağrısı ve kas ağrısıdır. Çoğu vakada önemli bir sekel bırakmaz (29).

Faz 3: Faz 3'te dış genital bölgedeki ülserasyon ile hipertrofik kronik granümatöz lezyon ortaya çıkar. Lenfatik tıkanıklık erkekte ve kadın genital sisteminde aynı zamanda elefantiyaza neden olabilir (29).

2.9.3. Yetişkinlerde Diğer Okülojenital Hastalıklar

İnklüzyonlu konjunktivit: Yetişkinlerdeki akut foliküler konjunktivit şeklindeki göz enfeksiyonları sıklıkla gözde yabancı cisim hissi vermektedir. Semptomlar genellikle tek taraflıdır. İlk iki haftada pürülan olan mukoid akıntı ve hiperemi baskındır. Bunu lenfoid folikül formasyonu (korneal lezyon ve epitelyal keratit ile beraber) kan damarı ve kornea tutulumu takip eder. Oküler trahomdan ayırt edilemez. Enfeksiyon genellikle komplikasyonsuz olarak iyileşmesine rağmen, tedavi edilmezse veya uygun tedavi edilmezse birkaç ayda persistan olabilir ve trahomdakine benzer skar oluşabilir (11,16).

Ürogenital enfeksiyonlar: Erkeklerde üretrit, epididimit, prostatit, proktit ve protokolite neden olurken, kadınlarda servisit, endometrit, salpenjit, ektopik gebelik, infertilite ve doğum komplikasyonlarına neden olurlar. Asemptomatik enfeksiyon erkeklerde yaygın olmasına rağmen, semptomatik gonokoksik olmayan üretritlerin %30-50'sinin, gonokoksik üretrit sonrası gelişen üretritlerin büyük bir bölümünün sebebidir. *C. trachomatis* gonokoksik üretritli erkeklerin %20'sinde izole edilebilmektedir. Semptomatik klamidyal üretritte inkübasyon periyodu genellikle 7-14 gündür. Gonokokal üretritlerdeki daha pürülan akıntının aksine beyaz, gri, bazen temiz olan akıntı ve dizüri vardır. Bu akıntı sadece sabahları olur ve çizgi şeklindedir. Bazı hastalar çamaşırdaki leke bırakmadığı için akıntıyı fark edemeyebilirler (30).

Enterobacteriaceae'ler (özellikle *E.coli*) 35 yaşından büyüklerde en sık olarak epididimite neden olurken, 35 yaş altı erkeklerde epididimitin en önemli sebebi *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae*'dir. Klamidya epididimiti akut fazda sıklıkla oligospermiyle birlikte. Fakat uzun dönem takip yapılmadığından infertiliteye neden olup olmadığı kesin değildir. Asemptomatik rektal taşıyıcılık hem yenidoğanda hem de yetişkinde olabilmektedir. *C. trachomatis* heteroseksüellerde proktit ve proktokolitin en önemli sebebidir. Proktokolitli hastalarda ateş, rektal ağrı ve tenesmus vardır (11).

Kadınlarda bu bakteriyle oluşan genital enfeksiyonlar asemptomatik olarak seyretmesine rağmen, sonuçlarından dolayı çok ciddi problem oluşturmalar (11,16). Endoservikal enfeksiyonların yaklaşık %70'i semptomsuzdur veya dizüri, hafif karın ağrısı, kanama, vajinal akıntı gibi hafif semptomları vardır (31). Endoservikal *C. trachomatis*'li kadınların %8'inde tahmini olarak akut salpenjit gelişmektedir. Endometrit aynı zamanda mukopürülan servisitli kadınların %40'ında mevcuttur ve tahminen tedavi edilmemiş salpenjite bağlı olarak gelişmektedir. Pelvik inflamatuvar hastalık, akut formdan perihepatit veya asit ile şiddetli hastalığa kadar giden klinik durumda gözükabilir (32). Hem akut hem de sessiz subklinik hastalığın uzun dönem sonucu, tubal infertilite, ektopik gebelik ve kronik pelvik ağrı sendromudur. Vaka kontrol çalışmalarında geçirilmiş klamidyal enfeksiyon serolojisi ile ektopik gebelik arasında güçlü bir birliktelik olduğu görülmüştür (32,33). Bir çalışmada ektopik gebelikli kadınların %22'sinde klamidyal HSP60'a karşı spesifik antikor tespit edilmiştir (33). *C. trachomatis*'in etken olarak kabul edildiği spontan abortuslu kadınlarda, endoservikal kültür negatifken antiklamidyal IgG titresi bulunmuştur. Bu da daha önceden geçirilmiş veya persistan enfeksiyonun spontan abortus ile beraber olabileceğini düşündürmektedir (11).

2.9.4. Yenidoğan Enfeksiyonları

Yenidoğan İnklüzyonlu Konjunktiviti

Yenidoğan enfeksiyonları genellikle doğum esnasında kazanırken, perinatal ve postnatal temas ile de kazanabilirler. Enfekte anneden doğan çocukların %22-44'ünde yenidoğan konjunktiviti gelişirken yaklaşık bunların %60'ında da serolojik pozitiflik vardır. Genelde inkübasyon doğumdan sonraki 5-12. gündür. Başlangıç bazen 6. haftaya kadar gecikebilir. Tipik sulu oküler akıntı oluşur. Progresif olarak daha pürülan hal alır, göz kapakları şişer, konjunktiva eritemli olur ve kalınlaşır. Doğumda konjunktivada lenfoid tabaka olmadığı için folliküller gelişmez, 3-6 hafta sonra ortaya çıkarlar (34).

Yenidoğan Pnömonisi

Enfekte anneden doğan çocukların %11-20'sinde pnömoni gelişebilir. Yenidoğanlarda öksürük, taşipne, nazal akıntı ve/veya tıkanma gibi semptomlar 8 haftadan önce ortaya çıkar. Bulgular genellikle orta derecededir ve ateş yoktur. Periferik eozinofili, arteriyel hipoksi ve serum immünglobulin seviyelerinde yükseklik karakteristiktir. Genellikle nazofaringeal sürüntü örneklerinden antijenin gösterilmesi ve antiklamidyal IgM

titresinin yüksek olması ile tanı konur. Hayatın ilk 6 ayında klamidyal pnömoni geçiren çocuklarda 8 yıla kadar astım ve obstüriktif akciğer hastalığının normalden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (35).

2.10. LABORATUVAR TANI

2.10.1. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Klamidyal enfeksiyonların laboratuvar tanısında geleneksel örnekler; konjunktival kazıntılar, üretral, servikal veya rektal kazıntı örnekleri, balgam, boğaz çalkantı sıvısı, doku biyopsileridir. Örnek alırken epitel hücrelerinin toplanmasına özen gösterilmelidir. Serolojik inceleme için de kan kullanılmaktadır (21,22).

Klamidyalar, zorunlu hücre içi patojenler oldukları için, hasta örneğinin alınmasının amacı; mikroorganizmaları içeren konak hücrelerinin toplanması olmalıdır. *C. trachomatis*'in genital sistem enfeksiyonlarında genellikle örnek alınan yerler kadınlarda endoserviks, erkeklerde üretradır. Kadınlarda yeterli miktarda kolumnar ve skuamokolumnar hücre içeren uygun örneğin alınması için spekulumla jinekolojik muayene yapılmalıdır. Eküvyon skuamokolumnar bileşkenin 1-2 cm ötesine serviks içine sokulup iki kereden fazla çevrilmeden önce iltihaplı bir akıntı varsa temizlenmelidir, eküvyon çıkartılırken vajen mukozasına dokunulmamalıdır (36).

Erkeklerden örnek, üretranın 3-4 cm içine kuru bir eküvyonun sokulup birkaç kez çevrildikten sonra çekilmesi şeklinde alınmaktadır. Örnek alınmadan önce idrar yapmak, testin duyarlılığını düşürebilir, çünkü enfekte kolumnar hücreler idrarla yıkanabilir. *C. trachomatis* kadın üretrasını da enfekte eder ve serviksin yanısıra üretradan da örnek alıp her ikisinin de ayrı ayrı laboratuvara göndererek daha iyi örnek toplanması sağlanabilir. Salpenjiti olan kadınlardan örnek alımı, etkilenen fallop tüpünden iğne aspirasyonu ile yapılabilir. Endometrium örneklerinden de klamidya izole edilmiştir. Diğer uygun örnek alınacak bölgeler, klamidyal göz enfeksiyonunda (trahom, inklüzyon konjunktiviti, yenidoğan konjunktiviti) konjunktiva, yenidoğan pnömonisinde nazofarinks ve daha derin solunum yolunu içerirler. Eşcinsel erkeklerde anal bölge ve farinksten alınan örnekler uygundur. LGV şüpheli olgularda, ülserlerden sürüntüler, bubon sıvısı aspirasyonları, rektal veya üretral sürüntüler, taşıma besiyerinde toplanmalıdırlar (37).

Toplanan örnekler, ortamdaki diğer bakteri ve mantarların üremesini engellemek için gentamisin, vankomisin ve amfoterisin B gibi antibiyotik ve antifungal etkenleri içeren “sucrose-phosphate buffer” (2SP) gibi bir taşıyıcı ortama konulur. Taşıyıcı medium asla penisilin içermemelidir. Çünkü penisilin *in vitro* inhibitör etki göstermektedir. Örneklerin toplandıktan hemen sonra veya kısa bir süre sonra inokülasyonu iyi bir kültür için tercih edilmektedir. Ancak taşıma besiyeri içinde +4°C’de 24 saat bekletilebilir. Daha uzun süre tutulması zorunlu ise hızla dondurulmalı ve -70°C’de saklanmalıdır. Dondurulmuş örnekler inokülasyondan hemen önce 37°C’lik su banyosunda hızla çözündürülmelidir. Bu tek dondurup çözündürme işlemi dahi enfektiviteyi azaltabilir (21).

2.10.2. Mikroskopi ile Direkt İnceleme

Klamidyalar tarafından oluşturulan inklüzyon cisimciklerinin Giemsa veya iyod ile boyanarak görülmesine dayanan tarihi bir yöntemdir. Bu yöntem günümüzde bazen neonatal inklüzyon konjunktiviti olgularında kullanılmaktadır (38). İyot boyası ile *C. trachomatis* inklüzyonlarının görülebilmesi olası ise de; bu yöntemle enfekte hücrelerde ancak gelişme döneminde glikojenin saptanabilmesi ve yine skuamöz hücrelerin normal koşullarda da glikojen içermelerinden dolayı, iyot boyası Giemsa boyasından daha az duyarlıdır (15).

2.10.3.Hücre Kültürü

Canlı sistemlerden fare inokülasyonu, rutin bir tanı yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Embriyonlu tavuk yumurtası sarı kesesine inokülasyon yöntemi ise tanısal değeri yüksek olmasına karşın, uygulamada karşılaşılan güçlükler nedeniyle günümüzde ancak antijen elde etmek amacı ile başvurulmuş bir tekniktir. Diğer taraftan klamidyal enfeksiyonların yaklaşık 30 yıldan beri çeşitli doku kültürlerinde üretilmekte olması, bu etkenlere bağlı enfeksiyonların laboratuvar tanısında önemli atılımların gerçekleşmesine olanak sağlamıştır. Halen doku kültürü, en duyarlı yöntem olarak klamidyal enfeksiyonların tanısında bir referans olarak kabul edilmekte ve “altın standart” olarak nitelendirilmektedir (15).

C. trachomatis üretilmesi için başta McCoy olmak üzere Hep-2, Hela 229 ve BHK-21 gibi birçok hücre tipi önerilmektedir. Bunlar arasında en çok kullanılanı insan sinoviyal hücrelerinden üretilen, ancak daha sonraları fare fibroblastları ile kontamine olmuş ve bugünkü özelliklerini kazanmış bir doku kültürü sistemi olan McCoy hücreleridir. Bu

hücrelerin ışınlanmaları veya üretildikleri ortama sikloheksimid gibi çoğalmalarını durduran bir madde eklenmesi halinde, klamidyaların izolasyon şansı çok artmaktadır. Aynı şekilde hastadan alınan örneğin doku kültürü üzerine santrifüj edildikten sonra ekilmesi, klamidyaların daha yüksek oranda üretilebilmelerine yardımcı olmaktadır (15,25,39). Klamidyalar sözü edilen doku kültürlerinde ortalama 48-72 saat içinde üremektedirler. İnkübasyon süresinin sonunda, klamidyaların üreyip üremedikleri, iyot veya Giemsa ile boyanması veya DFA yöntemi ile araştırılır. Enfekte hücrelerde klamidyaların üremesine bağlı olarak glikojen matriks lügol ile kırmızımsı kahverengi görünümde, EC'ler ise Giemsa ile mor renkte ve hücre nükleusunu kenara itmiş bir şekilde saptanırlar. Lamellerin fluoressein izotiyosiyanat ile işaretlenmiş monoklonal antikorlar kullanılmak suretiyle incelenmeleri halinde ise inklüzyon cisimcikleri, karakteristik yeşil kitleler halinde görülürler (15). Doku kültürü yönteminin duyarlılığı, teorik olarak %100 olmakla beraber, örnek alma, saklama, transport ve kullanılan yöntem gibi bazı faktörlerin etkisiyle bu oran %70-80'e düşebilmektedir (15).

2.10.4. Antijen Tayini

Antijen arama tekniklerinde kullanılan antikorlar, MOMP veya LPS antijenlerini tanımaktadırlar. Bunlardan biri, DFA tekniğidir. Bu tekniğin temeli hastalardan alınan klinik örneklerden hazırlanan preparatların fluoressein izotiyosiyanat ile işaretlenmiş *C. trachomatis* monoklonal antikorları ile karşılaştırılarak örnekte bulunan antijenlerin saptanmasıdır (40).

Kullanılan diğer bir antijen arama tekniği ise EIA'dır (41). EIA, DFA gibi tecrübeli bir göze ve immün floresan mikroskobu gibi ek donanım gerektirmez. Antijen antikor reaksiyonları spektrofotometrede okutularak saptandığından DFA'ya göre daha nesneldir (41). Optik immunoassay (OIA) adı verilen bir hızlı teknik ile ince film yüzeyinde oluşan antijen antikor etkileşimi antikoru tanıyan konjugat aracılığı ile gözle görülebilir hale getirilmektedir (42).

Son yıllarda klamidyal hastalıkların tanısı amacı ile geliştirilen çeşitli Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleri, bu alanda çalışan pek çok kişi tarafından büyük bir coşku ve yine aşırı bir iyimserlikle karşılanmıştır. Gerçekten de ELISA yöntemi, DFA testinin aksine objektif ölçütlere göre değerlendirildiği gibi, testi yapan için de daha uygulanabilir. Diğer taraftan ELISA yönteminde alınan örneklerin DFA

testinde olduğu gibi uygun olup olmadığını saptamaya olanak yoktur. Dolayısıyla saptanan yalancı negatif sonuçların da değerlendirilmesi mümkün olmamaktadır (43).

2.10.5. Serolojik yöntemler

Kompleman birleşme deneyi klamidyal antikorların gösterildiği ilk serolojik yöntemdir. Kompleman birleşmesinde kullanılan antijen, embriyonlu yumurtanın sarı kesesinde üretilen *C. trachomatis*'in kaynatılması ve fenolle karıştırılması ile elde edilir. Bu test psittakoz ve LGV için sıklıkla kullanılmakla birlikte oküler ve genital enfeksiyonlar için duyarlıdır. Daha sonra MIF yöntemi geliştirilmiştir (44).

MIF kompleman fiksasyon deneyine göre daha duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Bu yöntemle IgA, IgM, IgG antikorları ölçülebilmektedir. Ancak geçirilmiş enfeksiyonlara bağlı serokonversiyon bu yöntemin tanıda kullanılabilirliğini sınırlamaktadır. Bu antikorlar kültür olumsuz hastalarda da bulunabilmektedir. Serolojik testler, epidemiyolojik değerlendirmelerde, özellikle popülasyondaki klamidyaya ile karşılaşma oranının saptanmasını amaçlayan genel taramalarda kullanılmıştır (45).

Frei deri testi, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanısal testlerin olmadığı, uzun bir zaman sürecinde, *C. trachomatis*'in oluşturduğu LGV tanısında kullanılmıştır. Ancak Frei testi diğer klamidyalarla oluşan enfeksiyonlarda da olumlu sonuç verdiği için günümüzde kullanılmamaktadır (45).

2.10.6. Moleküler Tanı Yöntemleri

2.10.6.1. Nükleik Asit Hibridizasyonu (NAH)

Gen-Probe PACE 2 (Gen-Probe, Amerika) testiyle replike olan klamidyalarda çok sayıda kopyası olan ve türe spesifik olan klamidyal 16S rRNA geninin hibridizasyonu yapılır. Mevcut verilere göre bu test, antijen tespiti ve hücre kültürü yöntemleri kadar duyarlı ve nispeten biraz daha özgüldür (46).

2.10.6.2. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri (NAAT)

2.10.6.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR yöntemi klamidyal enfeksiyonların tanısında son yıllarda gittikçe artan oranlarda kullanılmaktadır. PCR testinde klamidyal özgül DNA parçası olarak 16S rRNA, ortak plazmid (kriptik plazmid) veya MOMP gen dizilimleri seçilir. PCR yöntemini doku kültürü ile karşılaştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre her

iki yöntem arasında %100 oranında bir uyum olduğu, bir başka deyişle PCR duyarlılığının %100 olduğu saptanmıştır. Hatta doku kültüründe üreme olmayan olgularda da, PCR yöntemi ile daha fazla pozitiflik saptanabilmektedir (15).

2.10.6.2.2. Ligase Chain Reaction (LCR)

Sistem DNA çoğaltılması amacı ile geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Bu sistem; primerlerden amplikonlar üretmek yerine, problemlerin amplifikasyonunu sağlar. PCR gibi termal döngü cihazına ihtiyaç duyulur. Termotabil ligaz enziminin kullanıldığı LCR ile sadece iki primer boyu kadar uzunlukta amplikonlar elde edilir. Denatürasyon işleminden sonra, kalıp tek zincirli DNA üzerindeki hedef dizilere peş peşe yerleşen oligonükleotid problemler, termotabil ligaz enzimi yardımı ile birleştirilirler (ligasyon). Ligasyona uğramış oligonükleotid çiftleri ve orijinal diziler bir sonraki siklusta kalıp olarak kullanılır. Böylece birinci siklusta iki adet kalıp DNA oluşur. Tekrarlayan denatürasyon, bağlanma ve ligasyon siklusları sonunda reaksiyon ürünlerinde eksponansiyel bir birikim gerçekleşir ve milyarlarca hedef dizi üretilir (47).

2.10.6.2.3. Transcription Mediated Amplification (TMA)

TMA; transkripsiyon bazlı, otokatalitik bir diğer izotermal RNA amplifikasyon yöntemidir. Sistem, RNA polimeraz ve reverz transkriptaz enzimleri yardımı ile RNA çoğaltılması esasına dayanır. Amplifikasyon işlemi sonunda ortaya çıkan amplikonlar RNA'dır. TMA ile her siklusta üretilen amplikonların sayısı 100-1000 arasında değişmektedir. Son derece hızlı ve duyarlı olan TMA yöntemi, RNA'nın DNA'ya göre daha labil olması nedeniyle, kontaminasyon riskini azaltarak özgüllükte artış sağlamaktadır (47).

2.10.6.2.4. Strand Displacement Amplification (SDA)

PCR'a benzeyen bu yöntem, *E. coli* DNA polimerazı Klenow parçasının çift zincirli DNA üzerinde kesimli tek zincir varlığında, bu noktadan bağlanarak, bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme yeteneğine dayanır. Bütün tepkime 37°C'de yürütülür ve primer bağlanması, kesilme, zincir ayrılması ve DNA sentezi PCR'da olduğu gibi özgül bir bölge geometrik olarak çoğaltılır. Yöntemin özgüllüğü yine sadece aranan etkene özgü DNA dizilerini tanıyacak primerlerin kullanılmasına bağlıdır (47).

2.10.6.2.5. Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Klasik PCR'dan farkı amplifikasyonun gerçek zamanlı (real time) olarak izlenmesidir. Avantajı ekstra görüntülemeye gerek duyulmaması ve kantitasyona olanak vermesidir. Ayrıca, dizilemeye gerek olmaksızın tek nükleotid farklılıkları saptanabilmekte ve genotiplendirme yapılabilmektedir. Değişik formatlarda tasarlanabilir. Özel bir saptama sistemine sahip PCR cihazı gerektirir. En çok viral yükün önem taşıdığı virüs hastalıklarında, çevre ve besin mikrobiyolojisinde (mikrop yükünün belirlenmesinde) kullanılmaktadır (47).

2.11. EPİDEMİYOLOJİ

C. trachomatis'in A, B, Ba ve C serovarları özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kırsal bölgelerde trahom (inklüzyonlu konjunktivit) etkeni olarak enfeksiyon oluşturur. Kuru ve sıcak iklim ile hijyen koşullarının sağlanamadığı durumlar bu enfeksiyonun riskini arttırmaktadır. Önlenebilir körlük olarak bilinen trahom, genellikle kirli eller, ortak kullanılan kirli eşyalar ve karasineklerle yayılan bir enfeksiyondur (37).

C. trachomatis'in D-K, L1, L2, L3 serovarları özellikle sanayileşmiş ülkelerde cinsel yolla bulaşan hastalıklar (CYBH) sorumlu tutulmaktadır. *C. trachomatis*'in bu ürogenital kökenleri, erkeklerde sıklıkla üretrit ve epididimit, kadınlarda ise servisit ve pelvik inflamatuvar hastalık oluşturmaktadır. Lenfogranüloma venerum ise *C. trachomatis*'in etkeni olduğu diğer bir veneryan hastalıktır (37). LGV dünyanın her yerinde görülen bir hastalıktır. Hastalığın başlıca kaynağı erkek homoseksüeller olup, Afrika ve Güney Amerika'da yaygındır. Akut LGV erkelerde, asemptomatik LGV ise kadınlarda daha sık görülmektedir (48).

C. trachomatis Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre tüm dünyada 1995 yılında 89 milyon kişide, 2001'de 92 milyon kişide enfeksiyona neden olmuştur (49,50). ABD'nde her yıl ortalama 4 milyon yeni vaka tespit edilmektedir. İngiltere'de 16-34 yaş grubu bayanların %5-12'sinin bu etkenle enfekte olduğu bildirilmiştir (51).

Genital klamidyal enfeksiyonlarının morbidite ve kadın sağlığı üzerindeki dramatik etkisi devam etmektedir. İngiltere'de 2000 yılında 60 000 den fazla vaka bildirimi olmuş ve ulusal takip rehberine göre 16 yaşından küçüklerde %13.8, 16-19 yaş arasında %10.5 ve 20-24 yaş arasında %7.2 oranında enfeksiyon varlığı bildirilmiştir.

Almanya’da %4.5 prevalansa karşılık olarak, %75’ini kadınların oluşturduğu 13 000 hastada enfeksiyon tanımlanmıştır. Yunanistan’da, 18-35 yaş grubu kadınlarda yaklaşık prevalans %7-10.6 olarak tespit edilmiştir (38).

DSÖ tarafından, 1990’larda hamile bayanlarda prevalans; İtalya’da %2.7, Fransa’da %3.9, Hollanda’da %4.9, Macaristan’da %5.4, İngiltere’de %6.2, Danimarka’da %6.7 ve İzlanda’da %8 olarak bildirilmektedir (38).

ABD’nde, *Chlamydia trachomatis*’in cinsel bakımdan aktif yaş grubundaki kadın popülasyonunda görülme sıklığı genellikle %10 dolayında iken CYBH kliniğine başvuran kadınlarda bu oran %40’ın üzerine çıkmıştır. Yenidoğanda görülen klamidy enfeksiyonları ise perinatal bulaş sonucunda oluşur. *C. trachomatis* ile enfekte annelerin yaklaşık %65’inin bebeklerinin vajinal kanaldan geçiş sırasında enfekte oldukları bildirilmiştir. *C. trachomatis* ile enfekte kadınların ise %50-70’i asemptomatiktir. Bu sonuçlar büyük bir bilinmeyen taşıyıcı popülasyonun varlığını gösterir ki, bu popülasyonun cinsel partnerlerine enfeksiyonu aktarırlar ve yenileyen enfeksiyonları sıktır. Tekrarlayan enfeksiyonlar ektopik gebelik, infertilite gibi sekellerin oluşma riskini artırır (16).

Türkiye’de *C. trachomatis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, özellikle ürogenital *C. trachomatis* enfeksiyonları 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, infertil 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 olarak bulunmuştur (52-56).

İstanbul’da yapılan bazı çalışmalarda gebe kadınlarda %1.1, hayat kadınlarında %22, hayat kadınları ile ilişki kuran erkelerde %14.7 oranında *C. trachomatis* enfeksiyonu saptanmıştır (57,58).

Ege Bölgesi’ndeki semptomlu hastalarda *C. trachomatis*’in prevalansını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, Ocak 2003-Mayıs 2005 tarihleri arasında toplam 333 hasta örneği toplanmıştır. Yapılan bu çalışmada kadınlarda %20 (15/75), erkelerde %20 (10/50), çocuk hastalarda %7.7 (16/208) oranında pozitiflik saptanmıştır. Tüm örnekler birlikte değerlendirildiğinde, bölgedeki *C. trachomatis*’in prevalansı %12.3 bulunmuştur (59).

2.12. KORUNMA

Hastalıktan korunmak için bir aşı mevcut değildir. *Chlamydia* enfeksiyonları bir veneryal hastalık olduğundan bu hastalıktan korunmak çok güçtür. Çünkü bu mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyon genellikle asemptomatiktir. Hastalığın kontrolü için vakaların tespiti, tedavilerinin erken yapılması ve eşlerin tedavilerinin de takibi gerekir. Enfekte anneye ise sezeryan uygulanması önerilmektedir (17).

Enfeksiyonlu veya asemptomatik taşıyıcılar tedavi edilerek, şüpheli kişilerle cinsel ilişkide kondom ve germisidli vajinal köpükler kullanılması ve cinsel eş sayısının azaltılması sağlanarak korunmada başarı elde edilir. Yüzme havuzlarının klorlanması, inklüzyon konjunktivit enfeksiyonun önlenmesinde önemlidir. Klamidya enfeksiyonlarının kontrolündeki başarısızlık; birçok olgunun asemptomatik oluşuna, tanıda uygulanan testlerin pahalı olmasına ve eşlerin tedavi kurallarına uymamasına dayanmakta ve bu nedenle enfeksiyonun insidansı artmaktadır. Korunma, cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklarda olduğu gibidir. *C.trachomatis* enfeksiyonlu kadın ve erkeklerin cinsel eşleri sağaltılmalı ve toplum, cinsel ilişkiyle bulaşan hastalıkları azaltacak yönde eğitilmelidir (14).

2.13. TEDAVİ

Trahomda tropikal antibiyotiklerin pek az faydası vardır. Sistemik antibiyotik tedavisi etkilidir ve hastalığın insidansını düşürmektedir. Eritromisin ile uyum düşükken, doksisisiklin genç çocuklarda kontrendikedir. Azitromisin tedavisinin 6 ile 12 ay sonra enfeksiyonu azalttığı görülmüştür. Ayrıca göz kapağı deformitesine bağlı olarak oluşan kornea hasarına bağlı körlüğü önlemek için cerrahi tedavi önemlidir (28).

Sülfonamidler LGV'da *in vitro* aktif olmalarına rağmen tedavide güvenilir değildir. LGV'un birinci ve ikinci fazlarının tedavisinde tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol, eritromisin ve rifampisin etkili olmaktadır. Center Diseases Control (CDC) tarafından doksisisiklin ile 21 günlük tedavi önerilmektedir. Eritromisin ve sülfisoksazol alternatif tedavi rejimidir. İlave olarak bubonlar sinüs formasyonu ve rüptürü engellemek için aspire edilmelidir. Antibiyotik tedavisi ile semptomlar sıklıkla azalır, fakat bubona etkisi zayıftır (29).

Komplike olmayan genital sistem enfeksiyonlarının tedavisinde, tek doz (1 gr) azitromisin tedavisinin yedi günlük doksisisiklin tedavisi kadar etkili olduğu bulunmuştur (11,16). Hamile kadınlar standart dozda eritromisini tolere edemezler ve tedavide amoksisilin önerilmektedir. Yetişkin inklüzyon konjunktivitinde tetrasiklin ve doksisisiklin 2 veya 3 hafta yeterlidir. Eritromisin etkili bir alternatiftir (11).

İnklüzyonlu konjunktivit tedavisinde topikal tedavi nazofarengeal taşıyıcılığı tedavi etmediği ve uygulama güçlüğünden dolayı tavsiye edilmemektedir. Eritromisin ile tedavisi 10 ile 14 gün olarak sürmektedir. Tedavi başarısı %80'dir ve ikinci kr gerekebilir. *C. trachomatis* pnömonisinde tedavi konjunktivite benzer ve başarı %80'dir (11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında yapıldı.

3.1. ÖRNEKLER

Şubat 2010-Mart 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum poliklinikleri ile Üroloji polikliniklerine genital akıntı ön tanısıyla başvuran ve genital enfeksiyon düşünülen 50 hastadan alınan sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Genital akıntı ön tanılı hastaların herbirinden ikişer adet steril plastik saplı dakron eküvyon ile üretral veya servikal sürüntü örnekleri alındı. Sürüntü örneklerinden birisi PCR ve DFA için kullanılmak üzere, diğer sürüntü örneği ise hücre kültüründe kullanılmak üzere *Chlamydia trachomatis* için özel taşıma besiyerine (Vircell, Spain) koyularak -70°C’de saklandı.

3.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DİREKT *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ANTİJENİNİN ARAŞTIRILMASI

Sürüntü örneklerinde *Chlamydia trachomatis* antijeni DFA (PathoD_x, Remel, Amerika) yöntemiyle kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Direkt Immunofloresan Antikor (DFA) Testi

Kit içeriği:

- Chlamydia reageni (fluoressein izotiyosiyanat ile işaretli MOMP antikor)
- Chlamydia kontrol slaytları
- Mounting medium

Testin uygulanması

1. Sürüntü örnekleri teflon kaplı lam üzerindeki bir kuyucuğa yayılarak kuruması için beklenildi.
2. Kuruyan preparat 5 dakika metanol ile tespit edildi.
3. Preparat nemli ortam oluşturulmuş petri içine yerleştirildi.
4. Preparattaki örneğin bulunduğu kuyucuğa bir damla Chlamydia reageni damlatıldı.
5. Preparat oda ısısında 15 dakika bekletildi.
6. Daha sonra deiyonize suyla hazırlanmış PBS ile 10-15 saniye şale içinde çalkalanarak yıkandı, kurulandı ve mounting medium damlatılarak lamelle kapatıldı.
7. Preparattaki kuyucuk floresan mikroskopunda x10 ve x40'lık objektif ile incelendi.
8. Teflon kaplı lam üzerindeki kuyucukta hücre dışında floresan veren en az 10 tane elementer cisim görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

3.3. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* DNA'NIN PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Bütün örneklerde nükleik asit izolasyonu QIAamp DNA Mini Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak test kitin prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Chlamydia trachomatis-DNA amplifikasyonu için Chlamydia Trachomatis 330/740 IC (Sacace, İtalya) kiti ile PCR işlemi uygulandı. PCR ürünleri jel elektroforezi ile değerlendirildi.

Nükleik asit izolasyonu

Örnekler çalışmadan önce 15-25⁰C oda sıcaklığına getirildi.

Kit içeriği

- Proteinaz K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AE
- QIAamp spin kolonu
- Toplama tüpleri (2 mL'lik)

Testte kullanılacak solüsyonların hazırlanışı

Buffer AW1 solüsyonunun üzerine 25 mL %96'lık etil alkol, buffer AW2 solüsyonunun üzerine ise 30 mL %96'lık etil alkol eklendi.

Sürüntü örneklerine uygulanan nükleik asit izolasyon prosedürü

1. 2 mL'lik transport besiyeri içinde bulunan sürüntü örnekleri vortekslendi, 200'er µL alınıp ependorf tüplere konuldu.
2. Her tüpe 20 µL proteinaz K eklendi.
3. Tüplere 200 µL Buffer AL eklenerek 15 saniye vortekslendi.
4. Tüpler 56°C'de etüvde 10 dakika inkübe edildi.
5. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
6. Tüplere 200 µL etil alkol ilave edildikten sonra 15 saniye vortekslendi. Tüpler kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.

7. Tüpler içindeki 620 µL'lik karışımın tamamı toplama tüplerine konulan kolonlara alındı ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
8. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW1 eklendi ve 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
9. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açılıp üzerine 500 µL buffer AW2 eklendi ve 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 3 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz toplama tüplerine konuldu. Hiçbirşey eklenmeden 20.000 x g'de (14.000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
11. Kolonlar santrifüjden alınıp temiz 1,5 mL'lik ependorf tüplerine alındı. Kolonların kapakları dikkatlice açıldı ve üzerine 100 µL buffer AE eklendi ve 1 dakika beklendikten sonra 6000 x g'de (8000 rpm/dak.) 1 dakika santrifüj edildi.
12. Kolonlar atılıp ependorf tüplerindeki nükleik asit PCR çalışması için çalışmaya alınana kadar en fazla iki gün -20 °C'de saklandı.

***C. trachomatis* DNA Amplifikasyonu**

Bütün örneklerde *C. trachomatis* DNA belirlenmesi için termal cycler cihazında (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) PCR işlemi uygulandı.

Kit İçeriği (Chlamydia Trachomatis 330/740 IC, Sacace, İtalya)

- PCR-miks-1 (55 adet test tüpünde kullanıma hazır halde)
- PCR-miks-2, 0.6 ml
- Pozitif kontrol C+, 0.2 ml
- Negatif kontrol, 1.2 ml
- Internal kontrol, 1.0 ml
- DNA-buffer, 0.5 ml
- PCR kitinde hedef bölge “cryptic plasmid” tir.

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Önceden %10'lik hipokloridli su ile silinmiş ve ultraviyole ışığı ile sterilize edilmiş laminar

akımlı kabin içerisinde çalışıldı. Amplifikasyon için kullanılacak kit +4 °C'den çıkarıldı.

2. PCR-miks-1 tüpleri soğuk bloğa dizildi.
3. 10'ar µl PCR-miks-2'den PCR-mix-1 tüplerine sırasıyla eklendi.
4. PCR karışımın bulunduğu bu tüplere sırayla 10'ar µl hasta örneklerinin DNA izolatları eklendi. Tüplerden birine 10 µl pozitif kontrol, birine de 10 µl negatif kontrol eklendi. Tüplerin kapaklarına hasta numaraları ve kontrollerin isimleri sırasıyla yazıldı.
5. Tüpler, termal cycler cihazı 95 °C'ye ısındığı zaman dizildi ve PCR programı başlatıldı. PCR programı aşağıdaki gibidir;

95°C'de	bekleme	
95°C'de	5 dakika	1 siklus
95°C'de	15 saniye	} 42 siklus
65°C'de	25 saniye	
72°C'de	25 saniye	
72°C'de	1 dakika	1 siklus
+4°C'de	∞	

6. Reaksiyon sona erdikten sonra PCR ürünleri cihazın içinden alındı ve +4°C'de saklandı.

Jel Elektroforezi ile PCR Ürünlerinin Değerlendirilmesi

1. 100 mL TBE 1X tamponu içerisinde 1 gr agaroz ısıtılarak eritildi. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra 3 µL 'ethidium bromide' katılarak tarak yerleştirilmiş olan yatay jel elektroforez tankına döküldü. Jel yarım saat içinde dondu ve kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak uzaklaştırıldı.
2. Çoğaltılan örneklerden 10'ar µL alıp üzerine 5'er µL yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucuklara yerleştirildi.
3. Jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü.

4. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 330 basepare (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiği pozitif kabul edildi.

3.4. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*'İN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE İZOLASYONU

C.trachomatis izolasyonunda McCoy hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarının bütün aşamaları önceden %70'lik alkolle ve ultraviyole ışınlarla temizlenmiş laminar akımlı kabinde yapıldı. Bütün örneklerden McCoy hücre kültürüne ekim yapıldı ve 37⁰C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücreler invert mikroskopuyla incelendi.

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar:

1. Hücre üretim besiyeri

- MEM Eagle Besiyeri (Earles Salts without L-glutamin)(IX) 500 mL
- 200 mM L-glutamin 6 mL
- Fetal bovine serumu (56⁰C'de 30 dakika inaktive edilmiş) 55 mL

pH: 7.8 (pH ayarlaması % 7.5'lik sodyum bikarbonat ile yapıldı.)

2. İzolasyon besiyeri

Hazırlanmış hücre üretim besiyerine aşağıda oranları belirtilen stok solüsyonlardan ilave edilerek hazırlandı.

- Vankomisin stok solüsyonu 0.6 ml
- Gentamisin stok solüsyonu 0.1 ml
- Mikostatin stok solüsyonu 0.5 ml
- Glükoz stok solüsyonu 6.0 ml
- Siklohekzimid 2.5 ml

pH: 7.2-7.4 arasında %7.5'lik sodyum bikarbonat ile ayarlandı.

3. Stok Solüsyonların Hazırlanışı

VANKOMİSİN STOK SOLÜSYONU: 1 şişe vankomisin (500 mg) 10 ml deiyonize su ile sulandırıldı, gerekli oranlarda ependroflara bölünerek saklandı.

GENTAMİSİN STOK SOLÜSYONU: Kullanıma hazır 50 mg/ml'lik gentamisin solüsyonundan gerekli oranlarda ependroflara bölünerek saklandı.

MİKOSTATİN STOK SOLÜSYONU: İçerisinde 500.000 Unit/ml mikostatin içeren solüsyon 25 ml deiyonize suda çözündü ve son konsantrasyon olarak 20.000 Unit/ml elde edildi, gerekli oranlarda ependroflara bölünerek saklandı.

GLÜKOZ STOK SOLÜSYONU: 59.4 gram glukoz 1000 ml deiyonize suda çözündü ve otoklavda steril edildikten sonra gerekli oranlarda falkon tüplere bölünerek saklandı.

* Vankomisin, gentamsin ve mikostatin 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

* Hazırlanan bütün stok solüsyonlar, steril edilip gerekli oranlarda bölündükten sonra çalışma yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

4. Siklohekzimid Hazırlanışı

A ÇÖZELTİSİ: 4 gram siklohekzimid 20 ml metanol içinde çözündü ve son hacim steril deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 0.22 µm filtreden süzülerek steril edildi.

B ÇÖZELTİSİ: Hazırlanmış olan A çözeltisinden 25 ml alınıp son hacim 75 ml'ye steril deiyonize su ile tamamlandı.

C ÇÖZELTİSİ: Hazırlanmış olan B çözeltisinden 1 ml alınıp 100 ml steril deiyonize suya tamamlandı (son konsantrasyon: 100 µ/ml). Hazırlanan C çözeltisi 5 ml hacimlerde dondurularak saklandı.

5. Fosfat Tamponlu Su Hazırlanışı (PBS)

NaCl 8.0 gr

KCl 0.2 gr

Na₂HPO₄ 1.15 gr

KH₂PO₄ 0.2 gr

800 ml deiyonize su içinde çözündü ve otoklavda steril edildi.

6. Tripsin Hazırlanışı

- 1.25 gr tripsin 50 ml Hank's solüsyonu içine eklenip manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı.

- Hazırlanan bu karışım üzerine PBS çözeltisinden 450 ml eklenerek dilüe edildi.
- pH 7.4 olacak şekilde sodyum bikarbonat ile ayarlandı.
- 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.
- 1 ml'lik eşit hacimlerde ependrof tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

7. Sodyum Bikarbonat Hazırlanması

7.5 gr sodyum bikarbonat 100 ml deiyonize su içinde çözünerek otoklavda steril edildi. +4 °C'de saklandı.

8. İyot Çözeltisi Hazırlanışı

- İyot 1 gr
- Potasyum iyodit 2 gr
- Distile su 300 ml

Manyetik karıştırıcı ile 1 gece karıştırılarak kristallerin erimesi sağlandı. Daha sonra kurutma kağıdından süzülerek ışık geçirmeyen şişelerde saklandı.

Hücre Kültürü

McCoy Hücrelerinin Pasaj Edilmesi

1. Tam tabaka teşkil etmiş olan hücre kültür şişesindeki (75 cm²) besiyeri alındı.
2. Hücreler 5 ml PBS çözeltisi ile yıkandı ve daha sonra PBS döküldü.
3. Yıkama sonucunda hazırlanan tripsinden 1 ml hücreler üzerine ilave edildi. Daha sonra hücre kültür şişesi 5-10 dakika 37 °C'de etüvde bekletilerek hücrelerin birbirinden ayrılması sağlandı.
4. Hücreler birbirinden ayrıldıktan sonra 10 ml hücre üretim besiyeri şişeye ilave edildi. Cam pipet yardımıyla pipetaj yapılarak hücrelerin şişe içerisinde homojen bir süspansiyonu sağlandı.
5. Hücre süspansiyonundan 3.5 ml alınarak yeni kültür şişesine kondu, böylece 3 ayrı yeni kültür şişesi oluşturuldu. Bu yeni kültür şişelerine 20'şer ml üretim besiyeri eklenerek 37 °C'lik % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.
6. Her gün besiyeri değiştirilerek invert mikroskopuyla incelendi. Tam tabaka hücre teşkil edilene kadar bu işleme devam edildi.

Muayene Maddelerinin Hücrelere Ekimi

1. Tam tabaka teşkil etmiş olan hücre kültür şişesindeki (75 cm²) besiyeri alındı.
2. Hücreler 5 ml PBS çözeltisi ile yıkandı ve daha sonra PBS döküldü.
3. Yıkama sonucunda hazırlanan tripsinden 1 ml hücreler üzerine ilave edildi. Daha sonra hücre kültür şişesi 5-10 dakika 37 °C'de CO₂'li ortamda bekletilerek hücrelerin birbirinden ayrılması sağlandı.
4. Hücreler birbirinden ayrıldıktan sonra yaklaşık 10 ml hücre üretim besiyeri şişeye ilave edildi. Cam pipet yardımıyla pipetaj yapılarak hücrelerin şişe içerisinde homojen bir süspansiyonu sağlandı.
5. Hücre süspansiyonunun üzerine 20 ml hücre üretim besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu süspansiyondan 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarının her kuyucuğuna 1'er ml dağıtıldı ve 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 1 gün inkübe edildi.
6. Hücrelerin plak tabanını kaplayıp kaplamadığı invert mikroskopuyla kontrol edildi. Plak tabanı hücre ile kaplandıktan sonra plak içinden üreme besiyeri pipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden alındı ve 1'er ml eşit oranlarda her kuyucuğa izolasyon besiyeri eklendi.
7. Muayene maddesi içeren taşıma besiyerleri 2 dakika vorteklendi ve taşıma besiyerinden 500 µl alınarak hücre içeren kuyucuklara ekim yapıldı. Plaklar 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 3 gün inkübe edildi. Her gün invert mikroskopuyla hücreler incelendi ve günlük olarak izolasyon besiyeri değiştirildi.
8. Hücre kuyucuklarının içindeki izolasyon besiyeri 72 saat sonra pipet yardımıyla boşaltıldı. Her kuyucuğa 500 µl PBS solüsyonundan eşit oranlarda eklendi ve plak tabanındaki hücreler ucu künt plastik pastör pipetleri ile kazındı ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan bu hücre süspansiyonunda iyot boyama ve DFA yöntemleriyle *Chlamydia trachomatis* inklüzyonları araştırıldı.

Hücre Kültüründe *C. trachomatis* antijeninin DFA ile araştırılması

Süspansiyon haline getirilen hücrelerde DFA (PathoD_x Chlamydia Culture Confirmation Kit, Remel, Amerika) yöntemiyle *C. trachomatis* inklüzyon antijenleri kit prosedürüne uygun olarak araştırıldı.

Kit içeriği

- Chlamydia doğrulama reageni (fluoressein izotiyosiyanat ile işaretli MOMP antikor)
- Mounting Fluid

DFA yöntemi;

1. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan pipet yardımıyla 20 µl alınıp teflon kaplı lamın bir kuyucuğuna damlatıldı ve oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
2. Kuruyan preparat üzerine % 98'lik etanol damlatılarak 10 dakika beklentildi ve sonrasında etanolün fazlası dökülerek oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
3. Preparat üzerine bir damla FITC ile işaretli Chlamydia doğrulama reageni damlatıldı ve nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. Teflon kaplı lam PBS ile 10-15 saniye kadar yıkandı.
5. Preparat üzerine bir damla Mounting Fluid damlatılarak lamel kapatıldı.
6. Preparatlar floresan mikrokobunda x10 ve x40'luk objektif ile incelendi. *C. trachomatis*'e özgü floresan veren inklüzyon antijenleri araştırıldı. Bir tane floresan veren hücre görüldüğünde test pozitif olarak değerlendirildi.

Hücre Kültüründe *C. trachomatis* Inklüzyonlarının İyot Boyama Yöntemiyle Araştırılması

1. Hücre süspansiyonundan pipet yardımıyla bir miktar alınarak lama yayma yapıldı ve oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
2. Kuruyan preparat üzerine metanol damlatıldı ve oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletildi.
3. Preparat üzerine iyot çözeltisinden damlatılarak 1 dakika bekletildi ve su ile yıkanarak boya fazlası ortamdan uzaklaştırıldı.
4. İmmersiyon yağı damlatılan preparat ışık mikroskobunun x100'lük objektifinde incelendi ve *C. trachomatis*'e özgü iyotla koyu kahverengi boyanmış inklüzyonlar araştırıldı. *C. trachomatis* inklüzyonları içeren pozitif preparatta sarı renkle boyanmış McCoy hücreleri içinde koyu kahverengi inklüzyonlar görüldü.

4. BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Poliklinikleri ile Üroloji Polikliniklerine, genital akıntı şikayetiyle başvuran 50 hastadan alınan sürüntü örneklerinin 49'u servikal sürüntü 1'i üretral sürüntü idi (Tablo 4.1).

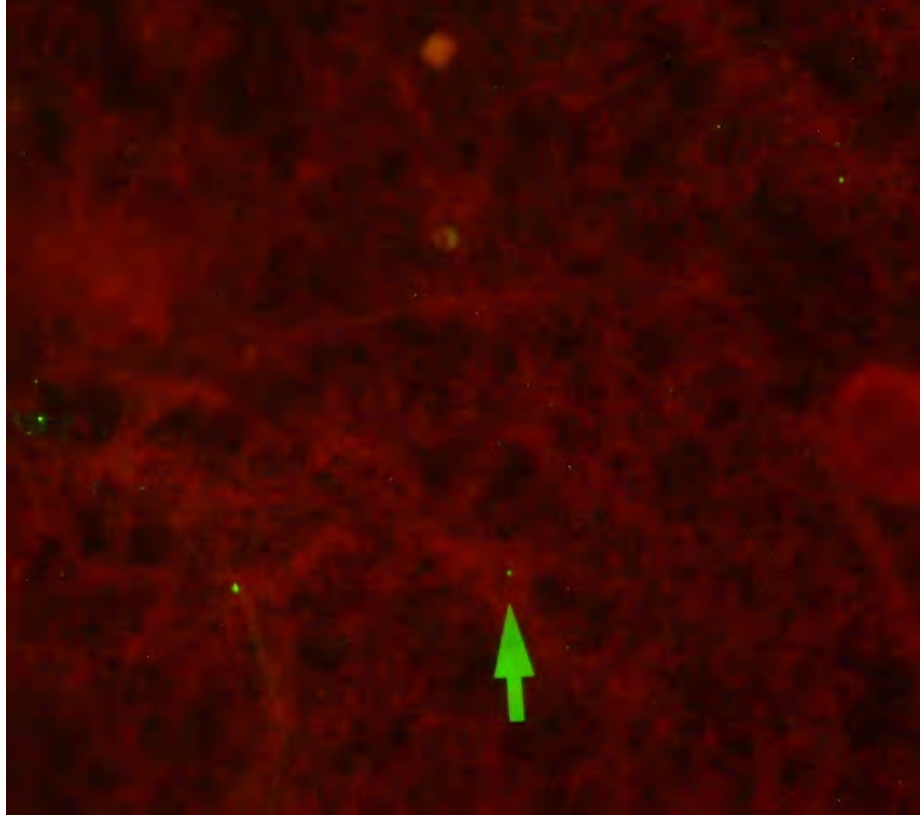
Tablo 4.1. Alınan örneklerin polikliniklere göre dağılımı

Örnek türü	KHDP	ÜP
Servikal Sürüntü	49	-
Üretral Sürüntü	-	1

KHDP: Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği, ÜP: Üroloji Polikliniği

4.1. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE DFA BULGULARI

Çalışmaya alınan 50 sürüntü örneğin 4'ünde (%8) *C. trachomatis* antijeni pozitif bulundu (Şekil 3). Kırkdokuz servikal sürüntü örneğinin 3'ünde, bir üretral sürüntü örneğinde *C. trachomatis* antijeni pozitif idi (Tablo 4.2).



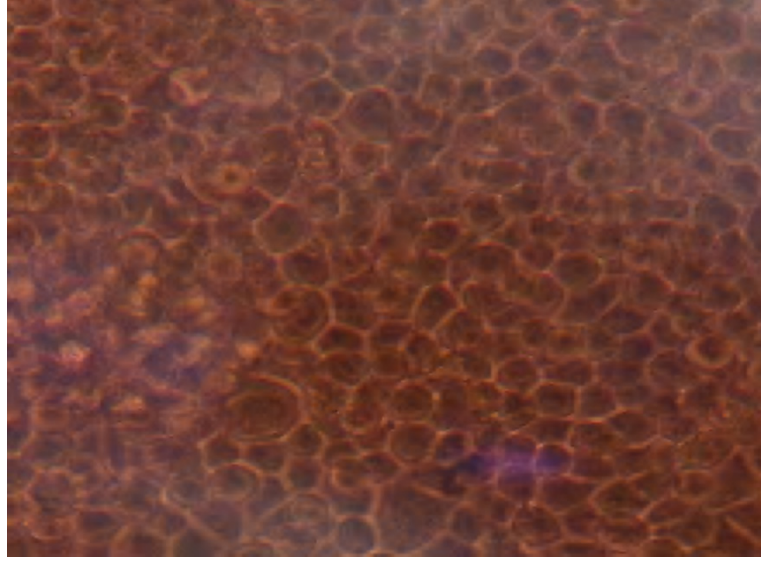
Şekil 4.1. DFA yöntemi ile *C. trachomatis* antijeninin gösterilmesi

Tablo 4.2. Sürüntü örneklerinde DFA bulguları

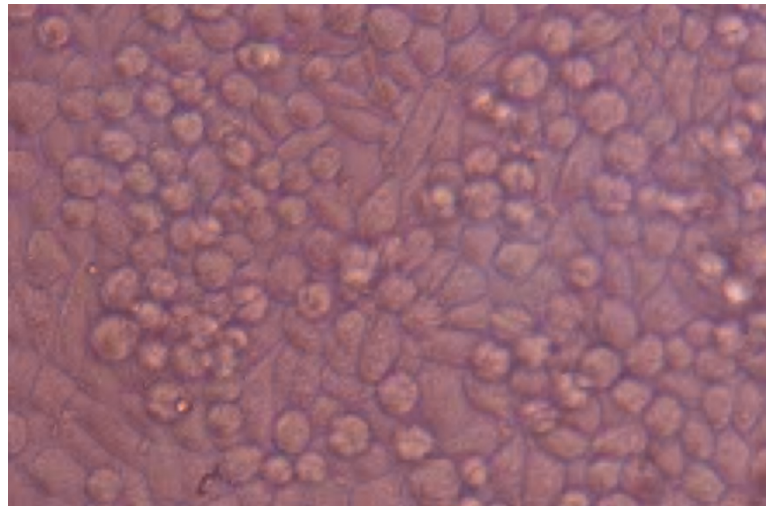
Örnek türü	DFA		TOPLAM
	Negatif	Pozitif	
Servikal Sürüntü	46	3	49
Üretral Sürüntü	-	1	1

4.2. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

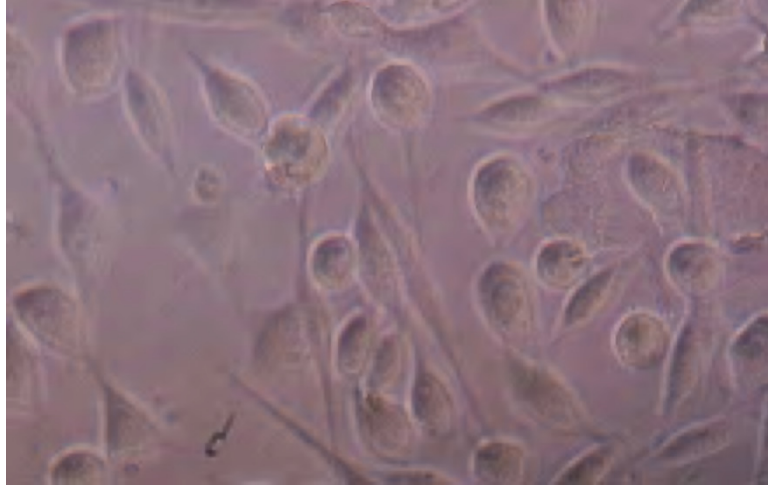
McCoy hücre kültürüne ekimi yapılan 50 sürüntü örneğinin hücre kültüründeki 24., 48. Ve 72. saatteki görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2, 4.3ve 4.4’de gösterilmiştir. Hücre kültürüne ekimi yapılan 50 sürüntü örneğinin 1’i (%2) DFA ve iyot boyama yöntemi ile pozitif bulundu (Şekil 4.5 ve 4.6) (Tablo 4.3).



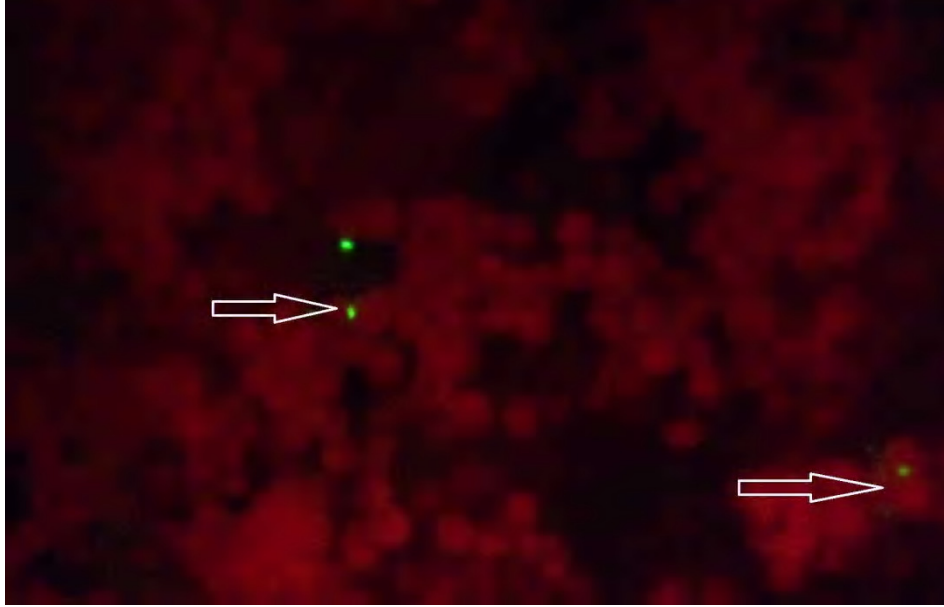
Şekil 4.2. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 24 saat sonraki görüntü



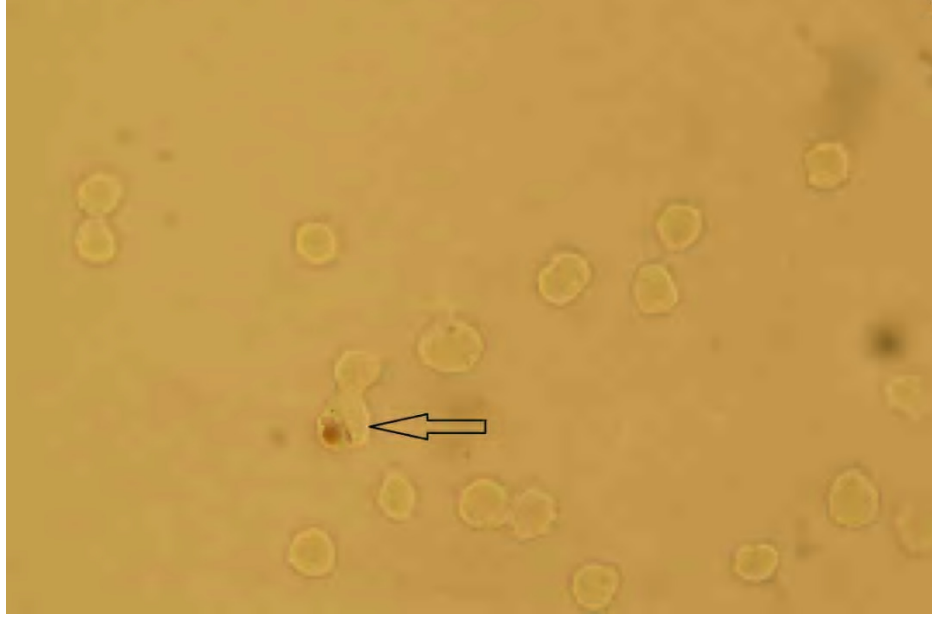
Şekil 4.3. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 48 saat sonraki görüntü



Şekil 4.4. McCoy hücre kültürüne ekim yapıldıktan 72 saat sonraki görüntü



Şekil 4.5. McCoy hücre kültüründe DFA yöntemiyle *C. trachomatis* antijenin gösterilmesi



Şekil 4.6. McCoy hücre kültüründe iyot boyama yöntemiyle *C. trachomatis* inklüzyonun gösterilmesi

Tablo 4.3. Sürüntü örneklerinde hücre kültürü bulguları

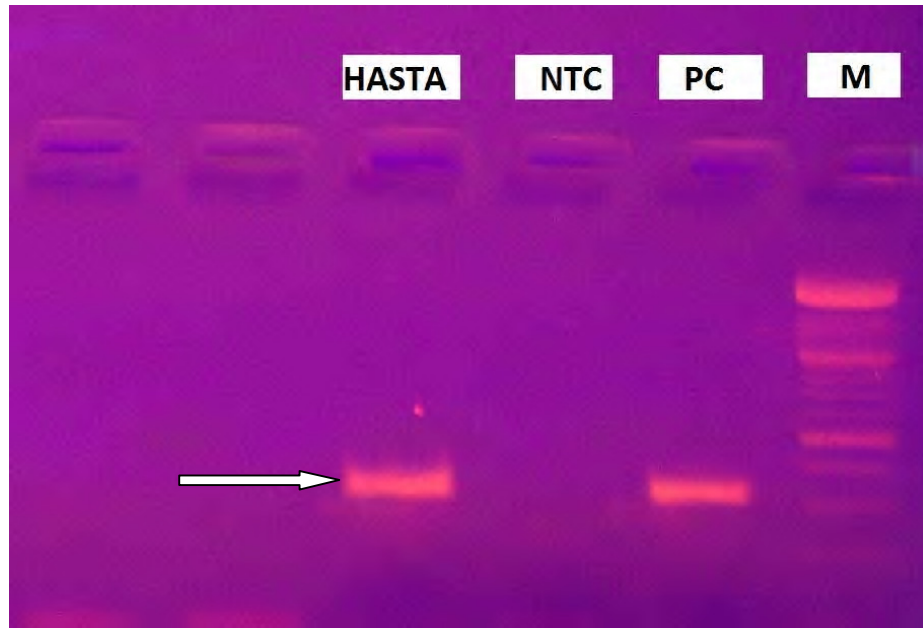
Örnek Türü	Negatif	Pozitif	Toplam
Servikal Sürüntü	49	-	49
Üretral Sürüntü	-	1	1
Toplam	49	1	50

4.3. SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNDE PCR BULGULARI

PCR ile çalışılan toplam 50 sürüntü örneğinin 1'inde (%2) *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu (Tablo 4.4 ve Şekil 4.7).

Tablo 4.4. Sürüntü örneklerinde PCR bulguları

Örnekler	PCR		Toplam
Servikal Sürüntü	49	-	49
Üretral Sürüntü	-	1	1
Toplam	49	1	50



Şekil 4.7. Jel elektroforez sisteminde *C. trachomatis*-DNA incelenmesi
(NTC: Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol, M: Marker)

4.4. DFA, PCR VE HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulguları hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırıldı ve Tablo 4.5’de özetlendi.

Sürüntü örneklerinde DFA bulguları ile hücre kültürü bulguları karşılaştırıldı. Bir örnekte hem DFA ile *C. trachomatis* antijeni pozitif bulundu, hem de hücre kültüründe *C. trachomatis* üremesi gözlemlendi. Ayrıca 3 servikal sürüntü örneğinde DFA ile *C. trachomatis* antijeni pozitif bulunurken, hücre kültüründe üreme olmadı.

Sürüntü örneklerinde PCR ve hücre kültürü bulguları karşılaştırıldı. Bir örnekte hem PCR ile *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu, hem de hücre kültüründe *C. trachomatis*

üremesi gözlemlendi. Kalan 49 örnekte *C. trachomatis* üremesi gözlenmediği gibi *C. trachomatis* DNA'da negatif bulundu.

Her üç yöntemle pozitif bulunan 1 örnek üretral sürüntü idi. DFA yöntemi ile *C. trachomatis* antijeni pozitif bulunan 3 servikal sürüntü örneğinde hem PCR hem de hücre kültürü ile *C. trachomatis* negatif bulundu (Tablo 4.5).

Hücre kültürünü altın standart kabul edip diğer testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı. DFA yönteminin duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %94, PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Sürüntü örneklerinde DFA ve PCR bulgularının hücre kültürü bulgularıyla karşılaştırılması

		Hücre Kültürü					
		Pozitif	Negatif	PCR		Pozitif	Negatif
DFA	Pozitif	1	3		Pozitif	1	-
	Negatif	-	46		Negatif	-	49

Tablo 4.6. DFA ve PCR yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri

Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
DFA	100	94
PCR	100	100

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde cinsel temasla bulaşan hastalıklardan en yaygın olanı *C.trachomatis* ile oluşan enfeksiyonlardır. Dünya üzerinde her yıl 50 milyon yeni *C.trachomatis* olgusu geliştiği sanılmaktadır. Tek başına bu rakam bile bu enfeksiyonun ne denli büyük bir sorun olduğunu ortaya koyabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 4 milyon yeni *C.trachomatis* enfeksiyonu olduğu, cinsel aktif kadın popülasyonunda *C.trachomatis* görülme oranı %10, cinsel hastalıklar kliniğine başvuran hasta popülasyonunda ise %25-40 olarak bildirilmektedir. Enfekte annelerden doğan bebeklerde bu enfeksiyona yakalanma oranı yaklaşık %65'tir (60,61). Kanada'da yapılan geniş kapsamlı epidemiyolojik bir çalışmada Manitoba'da pelvik inflamatuvar hastalık ve ektopik gebelik nedeni ile kliniğe başvuran kadınların yaklaşık %74'ünde *C.trachomatis* etken olarak bulunmuştur (62).

C.trachomatis, erkeklerde üretrit, epididimit, prostatit, proktit ve protokolite neden olurken, kadınlarda servisit, endometrit, salpenjit, ektopik gebelik, infertilite ve doğum komplikasyonlarına neden olurlar. Kadınlarda *C.trachomatis* enfeksiyonlarının önlenmesi, özellikle asemptomatik enfeksiyonlarda duyarlı ve spesifik özelliği olan tekniklerin gelişmesine bağlıdır. *C.trachomatis*'in tanısında kullanılan testlerin performansını etkileyen en önemli faktörler; hastaya, örneğin alınmasına ve taşınmasına

ait faktörlerdir. Hastanın özellikleri testin performansını etkiler. Örneğin tarama testleri, enfeksiyon prevalansının yüksek seyrettiği semptomatik gruplarda daha duyarlıdır. Uzun süreden beri hasta olan vakaların bulunduğu gruplarla genç hastalarda inklüzyon miktarı daha fazla olmakta, gonokok enfeksiyonları daha sık görülmektedir. *Chlamydia* inklüzyonları daha önce bu mikroorganizmayla temas etmiş kadınlarda daha düşük miktarda bulunur. Örnek sayısı ve toplandığı bölge *Chlamydia* sonuçlarını etkilemektedir. Kadınlarda birden fazla endoservikal örneğin alınması pozitif kültür oranını yükseltmektedir. Endoservikal örnekler üretral, ilk idrar ve rektal örneklerden daha iyi sonuç vermektedir. Örnek alınmasında kullanılan eküvyonlar sonuçları değiştirmektedir. Plastik saplı dacron eküvyonlar pamuk ve kalsiyum alginat eküvyonlarına tercih edilmelidir. Son yapılan çalışmalarda kolumnar epitel hücre hücre sayısının artması ile pozitifliğin on kat arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak transport ortamları ve örneklerin uygun şartlarda saklanması sonuçlar üzerine etkilidir. Bu arada kullanılacak testin seçimi ve performansı da son derece önemlidir. Özel tanı testlerinin maliyeti, reagent kullanılan cihazlar, personelin tecrübesi ve testin kendi özelliği de buna etkilidir (63).

C.trachomatis enfeksiyonlarının önlenmesinde en önemli yollardan biri laboratuvar tanısının doğru ve titizlikle yapılmasıdır. Yıllardan beri *C.trachomatis* enfeksiyonlarının standart tanısı doku kültüründe bakterinin izolasyonu ile yapılmaktaydı. ELISA ve DFA gibi kültür ile ilişkili olmayan birçok metod hücre kültürüne alternatif olarak kullanılmış ve bu testlerin hücre kültürüyle karşılaştırılması sonucunda pozitif örneklerin %90'ını tespit edebildiğini ortaya koymuştur. Son zamanlarda PCR ve LCR gibi nükleik asit amplifikasyon teknikleri bulunmuştur. Kültür ve kültür dışı tekniklerle karşılaştırıldığında bu testlerin avantajı diğer tekniklerden %10-20 kat daha fazla pozitif sonuç vermesidir (64).

MOMP'a ilişkin monoklonal antikorların kullanıldığı DFA yöntemi, hızlı sonuç veren *C.trachomatis* testleri içinde özgül olanlardandır. Ancak yine de bu testin doğru olarak değerlendirilebilmesi için deneyimli bir mikrobiyoloğa gereksinim vardır. Bu yöntemin özgüllüğüne etki eden en önemli etken, değerlendirmenin kişiye göre değişebilmesidir. Özellikle <10 sayıda elementer cisim saptanan örneklerde yinelemenin doğru tanı açısından uygun bir yaklaşım olacağı bildirilmektedir (36).

PCR, nükleik asitlerin amplifikasyonunda kullanılan *in vitro* ilk tekniktir. PCR’da ürünlerin kullanılması ile hedef nükleik asitler oldukça kısa bir süre içerisinde milyar kez amplifiye edilebilir. PCR amplifikasyonu için çeşitli hedefler seçilebilir. PCR’da hedef bölge olarak MOMP, ribozomal RNA ve kriptik plazmid gen bölgeleri kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli PCR çalışmalarında *Chlamydia* plazmiti, genitoüriner sistemden alınan örneklerde daha duyarlı sonuçlar vermiştir. Plazmid bazlı PCR’ın ticari kitlerinin sensitivitesi %92-100 arasında olduğu bildirilmektedir (63). Başka araştırmacıların tek örnekle yaptıkları çalışmalarda bu testlerin, kültür ve kültür dışı tekniklerden daha duyarlı olduğu bulunmuştur (64).

Hücre kültürü yöntemi günümüzde yerini PCR, LCR ve TMA gibi amplifikasyon bazlı yöntemlere bırakmaktadır. Ancak laboratuvar standardizasyonu, yeni bir testin duyarlılık ve özgüllük belirleme çalışmaları ve geniş kapsamlı projelerde hala referans yöntem olarak McCoy hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Ayrıca McCoy hücre kültürleri kullanılarak yapılan izolasyon çalışmalarında ortam şartları standardize edilip ideal koşullar yerine getirildiğinde duyarlılık oldukça yüksek olmaktadır (65,66,67).

Cheng ve ark. (68) 1138 asemptomatik erkeğin üretral sürüntülerinde PCR, LCR ve hücre kültürü yöntemleriyle *Chlamydia trachomatis*’i araştırmışlar; LCR, PCR yöntemlerinin hücre kültürüne kıyasla daha duyarlı olduğunu ancak üç yöntemin özgüllüğünün birbirine benzer olduğunu bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada, 800 idrar örneğini (607 kadın ve 193 erkek), 926 sürüntü örneğini (717 endoservikal sürüntü ve 209 üretral sürüntü) TMA ve hücre kültürü yöntemleri ile *C. trachomatis*’i araştırılmış ve idrar örneklerinde TMA yönteminin duyarlılığı %91.2 ve özgüllüğü %99.6, sürüntü örneklerinde TMA yöntemiyle duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada, hücre kültürünün duyarlılığı idrar örneklerinde %77.2, özgüllüğü %99.5; sürüntü örneklerinde %71.8, özgüllüğü %100 olarak bulmuşlardır (69).

Olafsson ve ark. (70) yüksek risk grubunda yer alan 203 kadında serviksten alınan sürüntü örneklerinde McCoy hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle, aynı hastaların idrar örneklerinde PCR yöntemiyle *C. trachomatis*’i araştırmışlardır. Servikal sürüntü örneklerinin 34’ünde hücre kültürü yöntemiyle, 38’inde PCR yöntemiyle; idrar örneklerinin 37’sinde PCR yöntemiyle *C. trachomatis* pozitif bulmuşlardır. Servikal sürüntü örneklerinde sırasıyla hücre kültürü ve PCR yöntemlerinin duyarlılığı %87 ve

%92 olarak; idrar örneklerinde PCR yönteminin duyarlılığı %95 olarak hesaplanmıştır. Genelev kadınlarında EIA ve PCR yöntemleriyle *C. trachomatis*'in araştırıldığı çalışmada PCR testinin duyarlılığı %57.9, özgüllüğü ise %61.2 olarak bulunmuştur (71).

Goessens ve ark. (72) farklı moleküler metod uygulayarak ilk akım idrarı örneklerinde *C. trachomatis* varlığını TMA, LCR ve PCR yöntemleriyle araştırmışlar, tüm yöntemlerle özgüllüğün %99'dan fazla olduğunu ve *C. trachomatis* prevalansını %7.7 olarak bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada PCR ve LCR yöntemlerini kültür yöntemiyle karşılaştırmışlar, PCR ve LCR yöntemlerinin daha duyarlı oldukları kanısına varmışlardır (73). Bu çalışmada kriptik plazmid gen bölgesinin hedef alındığı PCR yönteminde duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulundu. Çalışmanın sonuçlarının yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Shank ve ark. (74) *Chlamydia trachomatis* EB'lerin sayımında, kültür lizat dilüsyonlarını direk floresan antikor kiti ile boyamayı kullanan basit bir metod geliştirmiştir. *C. trachomatis* EB'leri floresan mikroskobu ve elektron mikroskobu ile sayılmıştır. DFA yönteminin araştırma amaçlı kantitatif ölçümlerde hızlı ve ucuz bir yöntem olduğu, elektron mikroskobu ile DFA tekniğinden iki kat fazla sayım yapıldığı sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada MOMP'a özgül antikorların kullanıldığı bir DFA kitinin, hücre kültürü ile karşılaştırılmasında, DFA yönteminin duyarlılığı %99, özgüllüğü %99.8 olarak bildirmişlerdir (75). Bu çalışmada MOMP'a özgül antikorların kullanıldığı DFA yönteminde duyarlılık %100, özgüllük %94 olarak bulundu. Çalışmanın sonuçlarının yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Ülkemizde İzmir bölgesinde yapılan bir çalışmada semptomatik ve asemptomatik 93 kadından alınan endoservikal sürüntü örneğinde DFA yöntemi ile *C. trachomatis* araştırılmış ve %34.4'ünde pozitiflik bulunurken duyarlılık ve özgüllük sırayla %50-96 ve %94-96 olarak bulunmuştur (53). İzmir bölgesinde DFA yöntemi ile yapılan çeşitli çalışmalarda *Chlamydia* enfeksiyon insidansının asemptomatik kadınlarda %23-27.3, semptomatik kadınlarda %32.4-42, infertil kadınlarda %8.5-11.5, genelev kadınlarında ise %25.4, konjunktivit olgularında %26.5 olduğu bildirilmiştir (52-56).

Ağaçfıdan (76) İstanbul'da yaptığı çalışmada *C. trachomatis* enfeksiyonu açısından risk oluşturan 560 kişiden alınan çeşitli klinik örneklerde (234 servikal örnek, 282 üretral örnek ve 44 rektal örnek) hücre kültürü yöntemi ile *C. trachomatis* araştırmıştır.

İncelenen muayene maddelerinde 234 servikal örneğin 45'inde (%19.2), 282 üretral örneğin 43'ünde (%15.2) ve 44 rektal örneğin 8'inde (%18.2) *C. trachomatis* izole edilmiştir. Ege Bölgesi'nde semptomlu 333 hastada (75 kadın, 50 erkek ve 208 çocuk) *C. trachomatis* prevalansını araştırmak için McCoy hücre dizisi ile shell-vial hücre kültürü yönteminin kullanıldığı çalışmada, erkek hastaların 10'unda (%20), kadın hastaların 15'inde (%20) ve çocuk hastaların konjunktival örneklerinin 4'ünde (4/13, %30.8), nazofarengeal örneklerinin 12'sinde (12/195, %6.1) *C. trachomatis* izole edilmiştir (59). Bu çalışmada McCoy hücre kültürü yöntemi ile 50 sürüntü örneğinin birinde (%2) *C. trachomatis* izole edildi.

Türkiye'de *C. trachomatis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi konusunda özel bir çalışma yoktur, bu konuda önemli bir boşluk vardır. Dünyada geçerli risk faktörleri, Türkiye için de kabul edilmektedir fakat toplumların kendine özgü davranış farklılıkları bulunduğundan risk faktörleride farklıdır. Bu konuda yapılacak çalışmalar toplumumuzda enfeksiyonun oluşturabileceği riskleri azaltacaktır.

Bu çalışmada *C. trachomatis*'in hücre kültüründe izolasyonu çalışmaya başladıktan 3 gün sonra tamamlanırken, DFA ve PCR yöntemleri çalışma başladığı gün birkaç saat içerisinde tamamlanmıştır. Bu çalışmada hücre kültürü, PCR ve DFA yöntemleriyle üretral sürüntü örneğinde *C. trachomatis* pozitif olarak bulunurken, 49 servikal sürüntü örneğinin 3'ünde DFA yöntemiyle *C. trachomatis* pozitif bulunmasına rağmen hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle negatif bulununan bu örneklerdeki DFA pozitifliği yalancı pozitiflik olarak yorumlandı.

C. trachomatis'in laboratuvar tanısında hücre kültürü "altın standart" olarak yerini korumakla birlikte, uygun koşulların her zaman sağlanamaması ve uygulama güçlüğü nedeniyle daha hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem olan PCR tekniği *Chlamydia trachomatis* araştırmalarında uygulanabilir. DFA yöntemiyle yalancı pozitiflikler olmakla birlikte PCR için uygun koşul olmadığı zaman, uygulama kolaylığından dolayı DFA yöntemi tercih edilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Gates W, Wasseheit JN. Genital chlamydia infections: Epidemiology and reproductive sequelae. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 1771.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir, 1990.
3. Tosun İ, Şanlıdağ T, Akçalı S, Özbakkaloğlu B. Reaktif artritli hastalarda Chlamydia trachomatis' in araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2005; 35: 25-30.
4. Wyrick PB, Knight ST, Paul TR, Rank RG, Babier CS. Persistent chlamydial envelope antigen in antibiotic-exposed infected cells trigger neutrophil chemotaxis. J Infect Dis 1999; 179: 954.
5. Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant Chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure. J Infect Dis 2000; 181: 1421.
6. Serter D. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İzmir, 1997; 21: 193-198.
7. Öztürk M, Selçukbiricik S. Mikrobiyoloji ve İmmunoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000; p: 88-90.
8. Serter D. Mikrobiyoloji. Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 1992; 15: 169-172.
9. Ertem E. III. Ulusal Chlamydia İnfeksiyonları Simpozyumu Program ve Simpozyum Kitabı ed. Aktepe OC, Ağaçfıdan A, Afyon, 2006; 87.

10. Kılıç A. Klamidyalar. T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Yardımcı Doçentlik Dersi, Ankara, 2002.
11. Jones RB, Batteiger B. Chlamydial Diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000; 1986-2003.
12. Fisher MA. *Chlamydia trachomatis* genital infections. W V Med J 1993; 89(8): 331-334.
13. Lilford RJ, Dalton ME. The wide range of chlamydial infection. British Med Jour 1987; 295:156-157.
14. Özbal Y. Klamidyalar. Kitabında: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş (Editör). Birinci Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
15. Albay A, Baylan O, Kısa Ö, Doğancı L. Klamidya Enfeksiyonları ve Laboratuvar Tanı Yöntemleri. GATA Ayın Kitabı, Ankara, 2003.
16. Schachter J, Chlamydia, Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases. Second Edition, Philadelphia, WB Saunders Company, 1998; 1980-1990.
17. Akan E. Tıbbi Mikrobiyoloji. 2.Baskı, İzmir Saray Medikal Yayıncılık San ve Tic Ltd Şti, 1993; 618-654.
18. Weiss E. Rickettsiae and Chlamydiae, Taxonomy, Manuel of Clinical Microbiology. Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, (eds). 5th ed, American Society for Microbiology, Washington DC, 1991; 1033-1035.
19. Peeling RW, Brunham RC. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. Emerg Infect Dis 1996; 2 (4), 307-319.
20. McClarty G. Chlamydia and the biochemistry of intracellular parasitism. Trends Microbiol 1994; 2: 157.
21. Baron EJ, Finegold SM. Chlamydia, Mycoplasma, and Rickettsia. Bailey Scott's Diagnostic Microbiology, 8th ed, The CV Mosby Co, Toronto, 1990; 558-563.
22. Bilgehan H. Chlamydiaceae, Klinik Mikrobiyoloji Özet Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları, İzmir, 1994; 461-471.
23. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of *C.trachomatis* attachment to eucaryotic host cells. Cell 1992; 89:881-889.
24. Erişim: <http://www.med.sc.edu>, Erişim tarihi:15.10.2010
25. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış yayınları, İzmir, 2002; 384-400.
26. Serter D. Klamidyalar. Kitabında: Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şir, İstanbul, 1997; 94-115.
27. Morrison RP, Lyng K, Coldwell HD. Chlamydial disease pathogenesis. Jour Exp Med 1989;169:663-675.

28. Bailey RL, Arullendran P, Whittle HC, Mabey DC. Randomized controlled trial of single-dose azithromycin in treatment of trachoma. *Lancet* 1993; 342 (8869): 453-456.
29. Perine PL, Osoba AO. Lymphogranuloma venereum. Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF (eds), *Sexually Transmitted Diseases*, 2nd ed, New York, McGraw-Hill, 1990; p195.
30. Bowie WR. Approach to men with urethritis and urologic complications of sexually transmitted diseases. *Med Clin North Am* 1990; 74:1543.
31. Nyirjesy P. Nongonococcal and Nonchlamydial Cervicitis. *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3: 540.
32. Quan M. Pelvic inflammatory disease: diagnosis and management. *J Am Board Fam Pract* 1994; 7: 110.
33. Barlow RE, Cooke ID, Odukoya O, Heatley MK, Jenkins J, Narayansingh G, Ramsewak SS, Eley A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridisation. *J Med Microbiol* 2001; 50: 902.
34. Hammerschlag MR, Roblin PM, Gelling M, Tsumura N, Jule JE, Kutlin A. Use of polymerase chain reaction for the detection of *Chlamydia trachomatis* in ocular and nasopharyngeal specimens from infants with conjunctivitis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 293.
35. Ratelle S, Keno D, Hardwood M, Etkind PH. Neonatal chlamydial infections in Massachusetts, 1992-1993. *Am J Prev Med* 1997; 13: 221.
36. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 160-184.
37. Schachter J, Stamm WE. Chlamydia. In, Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC, 1995; 669-670.
38. Spiliopoulou A, Lakiotis V, Vittoraki A, Zavou D, Mauri D. *Chlamydia trachomatis*: time for screening?, *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (9): 687-689.
39. Ağaçfidan A. Chlamydia enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı. *Flora Derg* 1997; 21: 27-34.
40. Tam MR, Stamm WE, Handsfield HH, Stephens R, Kuo C-C, Holmes KK, Ditzenberger K, Criegee M, Nowinski RC. Culture independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1984; 310: 1146-1150.
41. Jones MF, Smith TF, Houghlum AJ, Hermann JE. Detection of *Chlamydia trachomatis* in genital specimens by the Chlamydiazyme test. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 465-467.

42. 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* 1997; 35: 516-517.
43. Jackson LA. Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae. In, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2005; 2258-2262.
44. Wang S-P, Grayston JT, Alexander ER, Holmes KK. Simplified microimmunofluorescence test with trachoma-lymphogranuloma venerum (Chlamydia trachomatis) antigens for use a screening test for antibody. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 250-255.
45. Ustaçelebi Ş. Chlamydia İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı. Chlamydia İnfeksiyonları ve Tanıda Yenilikler. Kitabında: Arıç Ö, Badur S, Ağaçfıdan A (editörler). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:20, İ.Ü. Basımevi ve film merkezi, İstanbul, 1994.
46. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook III EW, Jones RB, Green TA, Schachter J, Stamm WE, Bolan G, Louis ME St and Martin DH. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3757-3763.
47. Tahran G. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 2002; 6 (3): 177-183.
48. Washington A, Johnson RE, Sanders LJr. Chlamydia trachomatis infection in the United States: what are they costing us?, *JAMA* 1987; 257:2070.
49. Vincelette J, Schirm J, Bogart M, Bourgault AM, Luijt DS, Bianchi A, van Voorst Vander PC, Butcher A, Rosenstraus M. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (1): 74-80.
50. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections Overview and Estimates, World Health Organization, Geneva, 2001.
51. Sugunendran H, Birley HD, Mallinson H, Abbott M, Tong CY. Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection in male patients. *Sex Transm Infect* 2001; 77 (6): 423-426.
52. Dereli D, Ertem E, Serter D, Yüce K. Evaluation of a direct fluorescent antibody test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endoservical specimens. *APMIS* 1991; 99: 961-964.
53. Ertem E, Dereli D, Serter D, Yüce K. Screening for *Chlamydia trachomatis* in a Turkish population. *Genitourin Med* 1991; 67: 354.

54. Ertem E, Dereli D, Serter D, Tavmergen E, Çapanoğlu R. İnfertil kadınlarda *Chlamydia trachomatis* insidansı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1991; 21: 47.
55. Ertem E, Dereli D, Serter D, Engin Ö. İzmir genelevinde çalışan kadınlarda *Chlamydia trachomatis* araştırılması. Mikrobiyol Bült 1993; 27: 335.
56. Dereli D, Ertem E, Serter D, Köse S, Haznedaroğlu G. Konjunktival örneklerde *Chlamydia trachomatis* araştırılması. Mikrobiyol Bült 1993; 327: 127.
57. 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 1993; 12: 395.
58. Yılmaz G, Türkoğlu S, Gerikalmaz Ö, Badur S. İstanbulda hayat kadınlarında *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonu prevalansının enzim immunoassay (EIA) ve immunofloresan (DFA) yöntemleri ile saptanması. 6. Ulusal Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi, Özet kitabı, Antalya, 1991; s:237.
59. Çiçek C, Bilgiç A, Yaygın E, Koturoğlu G, Yalaz M, Kurugöl Z, Nazlı O, Gündem G. Semptomlu Hastalarda *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonun prevalansı. İnfeksiyon Dergisi 2006; 20 (1): 27-30.
60. Hills SD, A Nakasima PA, Machbanks DG, Addiss JP Davis. Risk factors for recurrent C.trachomatis infections in women. Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 801-806.
61. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of C. trachomatis attachment to eucaryotic host cell. Cell 1992; 89:881-889.
62. 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 1994; 19: 876-883.
63. Schubiner H, Lebar W. *Chlamydia trachomatis* infections in women. Curr Probl Dermatol 1996; 24: 25-33.
64. Lebar WD. Keeping up with new technology: new approaches to diagnosis of *Chlamydia* infection. Clin Chem 1996; 42(5): 809-812.
65. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 119.
66. Ripa KT, Mardh P-A. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide treated McCoy cells. J Clin Microbiol 1977; 6: 328.
67. Ridgway GL, Taylor-Robinson D. Current problems in microbiology I. Chlamydial infections: Which laboratory test. J Clin Pathol 1991; 44: 1.
68. Cheng H, Macaluso M, Vermund SH, Hook III EW. Relative Accuracy of Nucleic Acid Amplification Test and Culture in Detecting *Chlamydia* in Asymptomatic Men. J Clin Mic 2001; p:3927-3937.

69. Ferrero DV, Meyers HN, Schultz DE, Willis SA. Performance of the Gen-Probe AMPLIFIED Chlamydia Trachomatis Assay in Detecting Chlamydia trachomatis in Endocervical and Urine Specimens from Women and Urethral and Urine Specimens from Men Attending Sexually Transmitted Disease and Family Planning Clinics. *J Clin Microbiol* 1998; p: 3230-3233.
70. Olafsson JH, Davidsson S, Karlsson SM, Palsdottir R, Steingrimsen O. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection in high-risk females with PCR on first void urine. *Acta Derm Venereol* 1996; 76(3): 226-227.
71. Germain M, Alary M, Guedeme A, Padonou F, Davo N, Adjovi C, Van Dyck E, Joly JR, Mahony JB. Evaluation of a screening algorithm for the diagnosis of genital infections with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* among female sexworkers in Benin. *Sex Transm Dis* 1997; 24(2): 109-115.
72. Goessens WH, Mouton JW, van der Meijden WI, Delen S, van Rijsoort-Vos TH, Lemmens-den Toom N, Verbrugh HA, Verkooyen RP. Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx and COBAS AMPLICOR, for detection of *Chlamydia trachomatis* in first void urine. *J Clin Microbiol* 1997; 35(10): 2628-2633.
73. Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, Suhonen S, Lahteenmaki P, Lehtinen M, Paavonen J. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6): 4489-4493.
74. Shank D, Jensen N, Wolfe D. A Method to Enumerate *Chlamydia trachomatis* by Counting DFA Stained Elementary Bodies on a Printed Microscope Slide, American Society for Microbiology 1999.
75. 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* 1990; 28: 2473-2476.
76. Aaçfidan A. *Chlamydia trachomatis*'in McCoy Hücre Kültürleri Yöntemi Kullanarak İzolasyonu. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 2000; 30: 114-120.

ÖZGEÇMİŞ

Osman ÖZÜBERK. 02.12.1983 yılında Kayseri ilinde doğdu. İlkokulu Avanos Altıpınar Köyü İlkokulu'nda, ortaokulu Avanos Çalış Kasabası Ortaokulu'nda, liseyi ise Kayseri Şeker Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'ne kayıt yaptırdı. Fakülteden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Yozgat Boğazlıyan ilçesi Özel Hisar Dersanesi'nde biyoloji öğretmeni olarak görev yaptı. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümüne yüksek lisans öğrencisi olarak kayıt yaptırdı. 2008 Eylül ayında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Viroloji Laboratuvar'ında biyolog olarak çalışmaya başladı. Halen aynı görevi sürdürmektedir. Bekardır.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
İLAÇ ARAŞTIRMALARI YEREL ETİK KURULU
(Talas Yolu Üzeri 38039 KAYSERİ Tel 0 352 437 49 10 -11 Faks: 0 352 437 52 85)

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU			
	PROTOKOL ADI	Klinik örneklerde çeşitli yöntemlerle chlamydia trachomatis araştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Osman Özüberk		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi		
	DESTEKLEYİCİ FIRMA			
	FAZİ			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☒ Ulusal	☐ Çok Merkez ☐ Uluslararası	

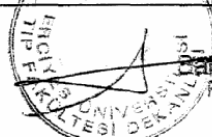
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	17.10.2008		Türkçe ☐ İngilizce ☐
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	17.10.2008		Türkçe ☐ İngilizce ☐
	OLGU RAPOR FORMU	17.10.2008		Türkçe ☐ İngilizce ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2008/548	Karar : 04.11.2008
	Fakültemiz Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Osman Özüberk'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çok merkezli araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının sorumlu araştırmacıya ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU						
Ünvanı / Adı Soyadı Ex Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ümit UKŞAL Başkan	Dermatoloji	E.Ü. Tıp Fak.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Murat AKSU	Nöroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	Radyodiagnostik	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ	Çocuk Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU	Üroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zübeyde ÇELEBİ Avukat	Avukat	E.Ü.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* Araştırma ile ilişkili
** Toplantıda bulunma



Sanrı YANCAR
Fakülte Şefi