

27612

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GENİTOÜRİNER SİSTEMDEN İZOLE EDİLEN MYCOPLASMA
HOMİNİS SUŞLARININ PREVALANSI İLE ANTİJENİK YAPILARI
VE HUMORAL İMMUNCEVABIN İMMUNOBLOT METODU İLE GÖSTERİLMESİ

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ PROF.DR.EROL AKAN

MEHMET S. SERİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ADANA - 1993

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
GİRİŞ	1 - 3
GENEL BİLGİLER	4 - 12
MATERYAL ve METOD	13 - 30
BULGULAR	31 - 34
TARTIŞMA	35 - 40
SONUÇ	41 - 42
ÖZET	43
KAYNAKLAR	44 - 50

Gerek tez konunun seçimi ve yürütülmesinde, gerekse Anabilim Dalında geçen eğitim sürem içerisinde yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı ve tez yöneticim Sayın Prof.Dr.Erol AKAN'a, her zaman yakın alâkalarını gördüğüm Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Kadri ÖZCAN'a, Doç.Dr.Fatih KOKSAL'a, Yard. Doç.Dr.Sait Yiğit'e, Yard.Doç.Dr.Fügen YARKIN'a ve Anabilim dalı araştırma görevlileri ile personeline özellikle tezimin yazım ve basım işlerinde olağanüstü fedakârlık gösteren Anabilim Dalı sekreteri Suna GÖKMEN'e, ayrıca materyal toplamada yardımcı olan Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği personeline sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Mehmet Sami SERİN

GİRİŞ

Mycoplasmaların Genitoüriner sistem (G.Ü.S) de lokalizasyonları ile bu sistemdeki çeşitli enfeksiyonlar arasındaki muhtemel ilişki uzun süre şüphe ile karşılanmış ve ekseriyetle bu mikroorganizmaların genital sistemin normal florasının bir üyesi olduğu düşünülmüştür. Öte yandan özellikle M.hominis tubal eskar ve peritubal adezyonlar gibi pelvis'in akut iltihabi hastalıklarında ortaya çıkan postinflamasyon sekeller ile infertilite ve ektopik gebelikten sorumlu major spesifik ajan olarak gösterilmektedir. Ayrıca bu mikroorganizma nongonokoksik üretrit ve vajinitlerle primer etyolojik ajan olarak sıklıkla izole edilmiştir.

M.hominis infertil hastalarda yüksek oranlarda izole edilirken (%35) asemptomatik kadınlardaki prevalansının da (%26) yüksek oluşu dikkat çekicidir. Ayrıca bazı raporlarda U.urealyticum'un asemptomatik gebe kadınlardaki yüksek kolonizasyonu ile neonatal enfeksiyonlar arasındaki ilişkiye de işaret edilmiştir. Genel olarak M.hominis'in daha çok infertiliteden U.urealyticum'un da spontan abortus ve ölü doğumdan sorumlu olduğu birçok araştırmacı tarafından iddia edilmiştir.

G.Ü.Sistemde meydana gelen mycoplasma enfeksiyonlarında tanı enfekte materyalden etkenin izolasyonu ve serolojik tetkikler yardımı ile konmaktadır. İzolasyonu için zenginleştirilmiş kompleks besiyerlerine ihtiyaç vardır.

Serolojik tanıda ise kompleman fiksasyon, indirekt hemaglutinasyon, floresan antikor, immunoperoksidaz, hemadsorbsiyon inhibisyon, üremenin inhibisyonu ve ELISA testleri kullanılır. Ancak birçok Mycoplasma suşuna karşı serumda kros reaktif immunoglobulinler meydana gelmektedir. Bu sebeble mycoplasmaların serolojik identifikasyonlarında tür spesifikliğinin sağlanması konvansiyonel serolojik metodlar ile mümkün olamamaktadır. Bu dezavantajdan dolayı da son yıllarda spesifik identifikasyon amaçlı bazı yeni teşhis metodlarının geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Bu metodların ortak prensibi mikroorganizmanın sahip olduğu tür spesifik yapı özelliklerini ortaya çıkarmaktır. Bu amaç ile geliştirilmiş olan metodlardan bazıları mikroorganizmanın DNA yapısındaki spesifik fragmentleri hedef alırken bazıları da membran yapısındaki antijenik yapıları hedef almaktadır.

Mikroorganizmanın DNA'sındaki hedef bölgeyi ortaya çıkarmak amacı ile uygulanan metodlar arasındaki gen-probe tekniği oldukça hassas sonuçlar vermiştir. Aynı amaç ile gerçekleştirilen ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kombine bir şekilde uygulanan southern hibridizasyon metodu ile de son derece hassas ve spesifik sonuçlar elde edilmiş ve birçok mycoplasma suşu bu metodlarla tanımlanmıştır.

Mycoplasmaların membran proteinlerinin elektroforetik analizleri sonucu ortaya çıkan protein profilleri tür spesifikliği göstermektedir. Mikroorganizmanın bu özelliğinden faydalanarak Immuno-Western blot metodu geliştirilmiştir. Bu metodda membran proteinleri önce elektriki bir ortamda molekül ağırlıklarına göre birbirinden ayrılırlar. Daha sonra nitrosellüloz gibi protein bağlayıcı bir membrana aktarılan proteinler bu ortamda spesifik antiserum ile reaksiyona sokulurlar. Proteinlerin önceden elektroforeze tabi tutulması antijen-antikor arasında oluşması muhtemel kros reaksiyon riskini ya tamamen ortadan

kaldırmakta veya önemli ölçüde azaltmaktadır.

immuno-western blot tekniğinin en önemli avantajlardan birisi de, genital sistemde lokalize olan M.hominis ile solunum yollarında enfeksiyon oluşturan M.pneumoniae arasında mevcut olan ve diğer serolojik metodlarla gösterilemeyen kros antijenik reaksiyonları, hücre membran proteinlerindeki farklı moleküler ağırlığa sahip identik fraksiyonlar yardımı ile ayırt etmesidir.

Biz bu çalışma ile hem genito-üriner sistem enfeksiyonlarındaki M.hominis sıklığını, hem de klinik örneklerden izole edilen M.hominis suşlarının membran protein profillerini elektroforetik migrasyon ve separasyonla gösterip, bu protein fraksiyonlarına karşı hasta serumlarındaki antikor cevabını tesbit etmeyi amaçladık.

Bu çalışma Ç.Ü.Araştırma Fonu tarafından SBE.91.E.10 nolu proje olarak desteklenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Mycoplasmalar:

Mycoplasmalar canlı hücre dışında üreyen en küçük mikroorganizmalar olup klasik bakteri tanımından farklı özelliklere sahip oldukları için Mollucutes (yumuşak derili organizmalar) adı altında ayrı bir sınıf içine yerleştirilmişlerdir. Bu sınıfın major kriteri hücre duvarının bulunmamasıdır. Bugün 60'ın üzerinde mycoplasma tipi tanınmakta, bunların çoğu memeli, kuş, insekt ve bitkilerde hastalık oluşturabilmektedir.

Tablo-1. Mollucutes sınıfının taksonomisi.

Takım	Aile	Genus	Tip sayısı	NADH	Sterole ihtiyacı	
Mycoplasmales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	64	Sitoplazmada	+	
		ureoplasma	1	Sitoplazmada	+	
	Acholeplasmataceae	Acheloplasma	8	Membranda	-	
	Spiroplasmataceae	Spiroplasma	1	Sitoplazmada	+	
	Sınıflandırılmayanlar	Ternoplasma	1			
		Anaeroplasmata	2			

Mollucutes sınıfında bir tek Mycoplasmales takımı bulunmakta olup takımın Mycoplasmataceae ve Acholeplasmataceae olarak tanımlanan 2 ailesi mevcuttur (Tablo-1).

Mycoplasmataceae familyası üyelerinde sitoplazmada lokalize olmuş NADH oksidaz ortak özellikken, metabolizmada kollesterol kullanımı ve kollesterole bağımlılık, Mycoplasma türleri, oldukça küçük narin ve pleomorfik koloni morfolojisi ile yüksek üreaz aktivitesi ve Tiny türleri (T.mycoplasmalar-Ureoplasmalar) için spesifik bir özelliktir (1,6,9,10).

Familya üyeleri arasında bu major farklılıklar dışında DNA'da G+C miktarı, metabolik ihtiyaçlar, antijenik yapı ve konak spesifitesi gibi diğer identik farklılıklar da görülür.

Acholeplasmataceae ailesinde üreme için kolesterol'e ihtiyaç duymayan mycoplasmalar (Acholeplasma) yer alır. Familya üyelerinden sadece A.laidlawii insan deri ve oral florasında saprofit olarak izole edilmiş olup diğer türlerin insan izolasyonları bildirilmemiştir (1).

Mycoplasmalar saprofit, parazitik veya patojenik olabilirler. Dünyanın her tarafında görülmekte, değişik dokulardan hatta tümörlerden bile izole edilmektedirler (1).

Son yıllarda genital sistemde lokalize olan bazı mycoplasma suşlarının genito-üriner sistem enfeksiyonlarında ve fetüsü ilgilendiren bazı defektlerde rollerinin olabileceği düşünülmüştür. Genel olarak üro-genital sistemde; M.hominis, M.genitalium, M.fermentans ve U.urealyticum türleri kolonize olmaktadır. Ancak M.genitalium ve M.fermentans'ın prevalanslarının oldukça düşük olması sebebi ile genellikle sadece M.hominis ve U.urealyticumun esas genital mycoplasma türleri oldukları kabul edilmektedir (20,35,52).

Genital mycoplasmaların prevalansı toplumun yaş, ırk, seksüel aktivite ve sosyoekonomik yapısı ile ilişkilidir. Özellikle birden fazla seks eşi değiştiren kadın ve

erkeklerden yüksek oranda izole edilmeleri, mycoplasma enfeksiyonlarının toplumun kültür yapısı ile olan ilişkisini göstermektedir (16, 35,54,55).

Mycoplasmaların genito-üriner sistem enfeksiyonlarında serviksovajinal örneklerden izolasyonunun yanısıra özellikle U.urealyticum'un hamile kadınlarda doğum sonrası görülen lohusalık humması vak'alarında vajen ve kan kültürlerinden diğer genital mycoplasmaların da erken membran rüptürü, düşük ağırlıklı doğum, spontan abortus ile yeni doğanın konjunktival hastalıklarında amniyotik sıvıdan izole edilmesi bu mikroorganizmalarla doğum defektleri arasında bir ilişkinin olabileceğini akla getirmiştir (10,21,25,31,35,36,38,45,46,50).

Ayrıca M.hominis'in septik arthrit, sepsis, kapak endokarditi, ventriküloperitonal şant enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, peritonit, ampiyem, neonatal menenjit ve ensefalit gibi ciddi ekstragenital enfeksiyonlara sebep olduğu da bildirilmiştir (7,39,41,59,60).

Morfoloji ve Boyanma Özellikleri:

Mycoplasmalar canlı hücre dışında üreyebilen en küçük mikroorganizmalar olup, enfekte dokularda genellikle intrasellüler olarak bulunurlar (24,25,40).

Mycoplasmalar 3 tabakadan oluşmuş bir hücre membranına sahiptirler. İnce kesitlerinin elektron mikroskopik analizi bu mikroorganizmaların çok basit, belki de otonom üreme kabiliyetine sahip olan en basit primitiv organizmalar olabileceklerini düşündürmektedir (32,40).

Bir mycoplasma hücresi; hücre membranı, ribozomlar ve prokaryotik nükleoid olmak üzere 3 organelden oluşmaktadır. Diğer tüm prokaryotların aksine mycoplasmaların hücre duvarları ve intrasellüler membran yapıları yoktur (32,40,43).

Mycoplasmaların hücre duvarlarının olmaması karakteristik morfolojik yapı oluşumunu engellemekte, osmotik farklılıklara, serum komplemanı, spesifik antikorlar, alkol ve deterjanlara duyarlılığını artırmaktadır. Buna karşılık hücre duvarı bulunmayan bakteri solit yüzeylere daha kolay penetre olabilmekte, in vitro şartlarda katı besiyerlerinin daha derin kısımlarına diffüze olarak uygun oksijen tansiyonu olan bölgelerde üreyebilmekte ve son olarak ta hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadır (10,13).

Mycoplasma hücrelerinin sadece bir tip membrana, yani sadece plasma membranına sahip olmaları, onları membran çalışmalarında en kullanışlı deney organizması kılmıştır. Zira çalışmalar esnasında diğer tip membranlar ile kontaminasyon riski, mycoplasmalarla yapılan çalışmalarda yoktur. Aynı özellik eritrositler için de söz konusudur. Ancak mycoplasmaların diğer bir avantajı in vitro şartlarda tam olarak gelişme ve üreme kabiliyetine sahip olmalarıdır (43,44,47).

Mycoplasmalar hem RNA hem de çift iplikli DNA ihtiva ederler (1,51). Hücre duvarlarının olmayışı sebebiyle bakterilere nazaran daha pleomorfiktirler. Yuvarlak şekilde olanlar 1-2 μm . bazen 150 μm . uzunluğundadır. Mycoplasmaların çoğu, ortalama delik çapı 0.22 μm . olan süzgeçlerden düşük basınçlarda geçememektedirler. Bu filtrasyon özelliği hücrelerin elastik tabiatıyla ilgilidir. Preparatların hazırlanması esnasında kullanılan değişik fizik ve şimik maddelerin etkisi ile şekillerinde değişiklik meydana gelmektedir. Elektron mikroskopik incelemelerde değişik morfolojik şekillerde görülürler. Streptokok zincirlerine benzeyen kokoid, dallanma gösteren flaman, armut, gözyaşı damlaları, topuz, yüzük veya yıldız şeklinde olabilirler (1,6,43).

Flajellaları olmamasına rağmen birkaç cinsinde hareket

bildirilmiştir. Bu harekette mikroorganizmalarda bulunan ve konağın epitel hücrelerine yapışması için bir organel olarak görev yapan terminal yapıların etkili olduğu gösterilmiştir (1). Mantarlardaki atrosporları andıran minimal reproduktif üniteleri (MRU) büyük viruslarınkine benzemektedir (43,52).

Hücre duvarına sahip olmadıklarından üreme şekilleri tipik bakterilerden oldukça farklıdır. Her ne kadar mycoplasmalarda bölünme mekanizması tam olarak bilinmemekte ise de mikroskopik gözlemler, elementer cisimciklerin dağınık birçok DNA komponentine sahip flamantöz hücrelerin (MRÜ) bölünmesi ile meydana geldiğini düşündürmektedir (1,52).

Gram boyası ile iyi boyanmazlar. Gram negatiftirler. Fakat Giemsa boyası ile iyi boyanırlar. Agar üzerindeki kolonilerinin boyanması için Dienesin boyama metodu en uygun olanıdır (1,40).

Üreme özellikleri:

Mycoplasmalar biyoşimik metabolik proseslerin bir çoğundan yoksun olduklarından ancak bol miktarda temel besin maddesi ihtiva eden oldukça kompleks zenginleştirilmiş besiyerlerinde üretilebilirler. Bu katkı maddeleri membrana ait lipid komponentlerin veya onların prekürsörlerinin sentezine imkân vermelidir (1,40).

Besiyerlerini zenginleştirmek amacı ile genellikle serum, serum komponentleri, kalb infüzyon, pepton ve maya özeti gibi maddeler kullanılır. Birçok mycoplasma türü ile Acholeplasma türlerinin hepsi, modifiye Edward vasatında üreyebilir (40).

Laboratuvar şartlarına adapte olmuş suşların bir çoğunun üretilmesi için bu vasata %5-10 at serumu da ilave edilmelidir. Vasata 20 mM. L-arginin'in ilavesi ile arginin dehidrolaza sahip olan non-fermentatif mycoplasmaların

üremesi de mümkün olur.

Üreme şartları:

Birçok mycoplasma türü, fakültatif anaerob olmasına rağmen, aerobik olarak daha iyi üremektedir. Bununla beraber birçok suşun primer izolasyonunda %95 N₂ ve %5 CO₂'li bir atmosfere ihtiyaç vardır. Gerekli optimal pH 6-8.5 arasındadır ve suşa göre değişim gösterir (52).

M.hominis optimal 37°C'de ve pH 7.8±0.2'de ürer. Agar üzerindeki kolonileri taze kültürlerde yaygın köpük şeklinde olup daha eski kültürlerde 200-300 µm. çapında tipik sahanda yumurta görünümündedir. Başarılı bir membran izolasyonu için mikroorganizmaların logaritmik üreme fazının sonunda hasara uğratılması gereklidir (1,6).

U.urealyticum 37°C'de ve pH 6.0±0.5'te ürer ve kolonileri daha küçüktür (15-30 µm.) (6).

Mycoplasmaların ürediği vasatlar oldukça zenginleştirilmiş olduğundan, yavaş üreyen mycoplasmalar ile beraber kontaminant olarak bir miktar bakteri ve mantar da görülebilir. Vasata penicillin ve yüksek konsantrasyonlarda talyum asetatın ilave edilmesi ile kontaminasyon riski önemli ölçüde azaltılır. Bakteriyel kontaminasyonun hızlı ve basit bir kontrolü 1 damla kültürün faz-kontras mikroskobu ile incelenmesiyle sağlanabilir (43,44).

Mycoplasma kültürlerinin saklanması:

Bazı mycoplasmaların sıvı kültürleri soğukta en az birkaç hafta muhafaza edilebilir. Bununla beraber haftada enaz 2 defa pasaj yapılması daha uygun bir yoldur. Ancak hücre sayısını sabit halde tutmak amacıyla sıvı kültürlerin -70°C'de muhafaza edilmesi tercih edilir (43).

Mycoplasmalar -70°C'de aylarca hatta yıllarca canlı halde saklanabilirler. Sıvı besiyerlerine son konsantrasyon

1.5 M. olacak şekilde dimetilsülfoksid (DMSO) veya gliserol ilavesi, dondurulma esnasında hücre ölümlerini minimum seviyede tutar. Dondurarak kurutma, mycoplasma kültürlerini canlı tutan diğer bir etkili metoddur (40,43).

Dirençlilik:

Mycoplasmalar nemli ısıya duyarlıdırlar. 55°C'ye 15 dakika, 60°C'ye 5 dakika dayanırlar. %1 fenol ve %0.5 formalin'e duyarlı olup birkaç dakikada ölürlar. U.urealyticum hariç, talyum asetat'a penicillin'e, ultraviyole ışınlarının etkisine ve soğuğa oldukça dirençlidirler. Dondurulmuş kültürleri yıllarca canlı kalır.

Hücre duvarları olmadığından osmotik basınç değişikliklerine duyarlıdırlar. Deterjan, alkol ve organik solventlere duyarlı olup kısa sürede harap olurlar (1,6).

Patogenez:

Mycoplasma'ların epitel hücrelerine adsorbsiyon yeteneği vardır. Bu özelliklerinden dolayı solunum epiteline ve vajen epitel hücrelerine adsorbe olarak solunum sistemi ve genito-üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olurlar (1,13,55).

Mycoplasma'lar, reseptör olarak konak hücre yüzeyinde bulunan spesifik molekülleri kullanırlar. Bu reseptör yerleri genellikle glikokonjugatlardır. Aynı zamanda sperm hücrelerine de, hücre yüzeyindeki spesifik sülfoglikolipid reseptörlere bağlanarak adsorbe olurlar. Bu reseptörlerin en önemlisi sülfogalaktoqli-serolipid'tir (SGG). Mycoplasmaların bu reseptöre bağlanması, spermin yumurtaya penetrasyonunu azaltmakta, dolayısıyla fertilitede bir azalma olmaktadır (13,25,26,47).

U.urealyticum'un bazı serotiplerinin fosfolipaz A1, A2 ve C aktivitesi gösterip plasentada bulunan fosfolipidleri degrade ederek prematüre doğum, spontan abortus veya

perinatal enfeksiyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (34,35,36).

Hastalarda mukoid veya mukopurulan bir akıntı ile pelvis bölgesinde görülen ağrı en sık rastlanan klinik bulgulardır. Sekunder enfeksiyon etkenlerinin iştiraki ile klinik bulguların şiddetlendiği görülür (1,6).

Laboratuvar tanısı:

G.Ü.S. mycoplasma enfeksiyonlarında tanı, enfekte materyalden etkenin izolasyonu yanında serolojik testler yardımı ile konur (35).

izolasyon için zenginleştirilmiş kompleks besiyerlerine ihtiyaç vardır. Bu maksatla inaktif at serumu ihtiva eden, BHI agar, triptikaz soy agar, yumurta albuminli besiyeri ve sükroz fosfat 4 (SP4) besiyerleri kullanılır. Sıvı transport besiyerine alınan örnekler soğukta zenginleştirmek amacı ile +4°C'de 18 saat bekletilirler. Daha sonra %10 CO₂ ihtiva eden atmosferde 37°C'de 24-48 saat inkubasyonda bırakılırlar. Süre sonunda katı besiyerine ekim yapılarak yine aynı atmosfer şartlarında 24-48 saat inkübe edilirler. Agar üzerindeki koloniler küçük büyütmele objektiflerle incelenerek sayılır.

Agar üzerindeki mycoplasma kolonileri taze kültürlerde köpük şeklindedir. Ancak 3-4. günlerde karakteristik sahanda yumurta görünümünü kazanırlar. Bu özellikleri kolonilerin Diennes boyası ile boyanmaları ile belirlenir (1,40,43,44).

Mycoplasmaların serolojik tanısında kompleman fiksasyon, indirekt hemaglutinasyon, floresan antikor, immunoperoksidaz, hemadsorbsiyon inhibisyon, üremenin inhibisyonu, metabolik inhibisyon, ELISA, immunoşimik metodlar (immuno-western blot,dot blot) ayrıca, gen-probe, southern hibridizasyon, PCR ile kombine southern hibridizasyon metodlarından faydalanılır (1,2,7,8).

Tablo-2. insan mycoplazmalarının biyolojik özellikleri.

Tür	Gelişme süresi	Glikoz	Arzinin	Üre	üremenin inhibis.		β hemoliz
					T.aset.	M.Blue	
<i>M. buccale</i>	3-5 gün	-	+	-	-	-	+
<i>M. foveium</i>	3-5 gün	-	+	-	-	-	+
<i>M. fermentans</i>	5-7 gün	+	+	-	-	-	+
<i>M. hominis</i>	1-2 gün	+	+	-	-	-	-
<i>M. lipoptilum</i>	3-5 gün	-	+	-	-	-	+
<i>M. pneumoniae</i>	5-7 gün	+	-	-	-	-	+
<i>M. orale</i>	5-7 gün	-	+	-	-	+	-
<i>M. salivarium</i>	3-5 gün	+	+	-	-	-	+
<i>M. tiny</i>	1-2 gün	-	-	+	+	+	+

Tedavi:

Laboratuvar tanısı uzun zaman aldığından tedavi klinik teşhis ve epidemiyolojik bilgilere göre yapılmaktadır. Urogenital sistem mycoplasma enfeksiyonlarında seçilen antibiyotik tetracycline'dir. Tedavi 10 gün süreyle 4x500 mg. şeklindedir. Ayrıca streptomycin, chloramphenicol ve kanamycin de etkili ilaçlardır (1,3,5).

Epidemiyoloji:

Mycoplasma'ların G.Ü.S.'de görülme sıklıkları sosyo-ekonomik yapı, yaş, ırk, cinsel aktivite, hamilelik gibi hormonal değişikliklere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. İnsanın *M. hominis* ve *T. mycoplasma*'larla ilk teması doğum kanalından geçiş esnasında olmaktadır. Kız çocuklarında genitoüriner sistem lokalizasyonları ergenlik döneminden sonra oldukça sık görülmektedir. *M. hominis* ve *M. tiny*'nin normal şartlarda ergenliğin başlangıcı ile menstrüel dönemin sonuna kadar olan süredeki kadınların %5-20'sinin genitoüriner sisteminde lokalize olabildikleri bildirilmiştir. Cinsel yönden aktif olup endometrit, salpinjit ve servikovajinal şikayetleri olan kadınlarda yapılan izolasyon çalışmalarında *M. hominis* serviks'ten %55-60 oranında izole edilmiştir (3,6,35,62).

MATERYAL ve METOD

Mycoplasma hominis'in kadınlarda genitoüriner sistem enfeksiyonlarındaki insidansı ile izole edilen mikroorganizmaların antijenik yapıları ve sebep oldukları humoral immun cevabın tesbiti amacı ile planlanan bu çalışmada 18.6.1992-30.7.1992 tarihleri arasında Ç.Ü.Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları polikliniğine müracaat eden vaginitis tanılı 55 hastadan alınan vajen sürüntüleri ve idrar örnekleri ile venöz kan örnekleri materyal olarak incelenmiştir.

Vajen sürüntü örnekleri steril pamuklu eküvyonlar yardımıyla alınarak M.hominis selektif transport besiyerleri içerisinde taşınmıştır. En kısa sürede laboratuvara getirilen transport besiyerleri buzdolabına konulmuş ve +4°C'de 18 saat bırakılarak örneklerin soğukta zenginleştirilmesi sağlanmıştır.

Hastalardan alınan idrar örnekleri laboratuvara ulaştırıldığında 1000 d/d'da 10 dakika santrifüj edildikten sonra, üst kısmı atılmış, dipteki çöküntüden steril bir pipet yardımı ile 0.3'er cc. alarak M.hominis selektif transport besiyerlerine ekilmiştir. Bu besiyerleri daha sonra 18 saat +4°C'de inkube edilmiştir. Bu süre sonunda buzdolabından çıkarılan transport vasatlar %10 CO₂ ve %90 N₂'lu atmosferde 37°C'de 18-24 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içinde vasatlardaki pH değişikliği üreme için kriter kabul edilmiş, üreme olan transport

ortamdan steril pipet yardımıyla alınan örnekler spesifik M.hominis vasatına ekilmiştir. Yine aynı atmosferik şartlarda 48-72 saatlik inkubasyondan sonra tanı, kolonilerin X10 büyütme ile direkt veya Dienes metodu ile boyanarak, mikroskopik muayene ile konmuştur. Mycoplasma olarak tanımlanan koloniler hemoliz özellikleri ile identifiye edilmiştir.

immunoblot: M.hominis olarak identifiye edilen kolonilerden selektif sıvı besiyerlerine pasajları yapılan bu kültürler -20°C'de dondurularak muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu kültürlerden 100-200 cc.'lik M.hominis selektif transport sıvı besiyerlerine ekim yapılarak %10 CO₂, %90 N₂'lu ortamda 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. Üreme olduktan sonra hücreler santrifügasyon ile toplanarak 3 defa 0.25 M. NaCl solusyonu ile yıkanmış, daha sonra bu hücreler osmotik lizis'e uğratılarak parçalanmış ve elde edilen membranların solubilizasyonu ile membran proteinleri ekstre edilmiştir. Bu ekstratlar SDS-PAGE'ne tabi tutularak proteinlerin elektroforetik analizi sağlanmıştır.

Elde edilen protein solüsyonu'nun bir kısmı 0.3'er cc. olarak ve birer hafta ara ile 3 kez beyaz tavşanlara intraperitoneal yolla verilerek tavşanlar immunize edilmiştir. Son injeksiyonu takip eden 3. haftanın sonunda tavşanlardan elde edilen serumlar, immunizasyonda kullanılan izolman suşların antijenik güçleri ile serolojik immunokimyasal profillerini tespit için bir ölçü olmak üzere immunoblot'ta primer antikor olarak kullanılmıştır. Bu amaçla jelden nitrosellüloz membranına izolman suşların protein transferleri yapılmış, sonra izolasyon yapılan hastalardan elde edilen serumlar primer ve kros olarak reaksiyonlara sokulmuş ve aynı işlem immunize tavşan serumları ile de gerçekleştirilmiştir. Hasta serumları ile yapılan işlemlerde sekonder antikor olarak peroksidaz konjuge anti-human IgM (The binding site 62999A) kullanılırken, tavşan serumu ile yapılan muamelede sekonder

antikor olarak peroksidaz konjuge anti-rabbit IgM (The binding site 63047B) kullanılmıştır. Ortama, enzim substratı olarak 3-amino-9-etilkarbazol (Aldrich 10.63870) ilave edilerek spesifik bantların boyanması sağlanmıştır. Ayrıca çalışmalarda standard marker proteinlerin kullanılmasıyla jelde elde edilen bantlardaki proteinlerin ve spesifik olarak boyanan proteinlerin molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

TRANSPORT AMACIYLA KULLANILAN BESİYERİ

M.hominis selektif transport besiyeri:

Beyin-kalb infüzyon buyyonu	144 cc.
inaktif at serumu	40 ml.
Maya Ekstresi (%25) (Difco)	10 ml.
Penicillin (500x10 ³ U/ml.)	1 ml.
Fenol kırmızısı (%0.2)	5 ml.
Talyum asetat (1/80)	1 ml.
Arginin monohidroklorür (%20)	5 cc.

Beyin-kalb infüzyon buyyonu pH 7.8±0.2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika (otoklavda) sterilize edildi. 40°C'de filtrasyon ile sterilize edilen diğer solusyonlar ve penicillin ilave edilerek 3'er cc.lik miktarlarda küçük tüplere dağıtıldı.

İZOLASYON AMACIYLA KULLANILAN BESİYERİ

Spesifik M.hominis vasatı:

Beyin-kalb infüzyon buyyonu	144 cc.
Nobel agar (Difco)	1.5 gr.
inaktif at serumu	40 ml.
Maya Ekstresi (%25) (Difco)	10 ml.
Penicillin (500x10 ³ U/ml.)	1 ml.
Fenol kırmızısı (%0.1)	1 ml.
Talyum asetat (1/80)	2 ml.
Arginin monohidroklorür (%20)	10 cc.

Beyin-kalb infuzyon ve Nobel agar karışımı pH 7.8±0.2'ye ayarlanıp 121°C'de 15 dakika (otoklavda) sterilize edildi. Filtrasyonla sterilize edilen diğer maddeler ve penicillin 40°C'e kadar soğutulmuş olan agar karışımına ilave edilerek 6 cm. çapındaki petri kutularına döküldü.

İDENTİFİKASYON İÇİN KULLANILAN TEST

Dienes boyama metodu:

Stok Dienes boyasının hazırlanışı:

Metilen mavisi	2.5 gr.
Azur II	1.25 gr.
Maltoz	10 gr.
Na ₂ CO ₃	0.25 gr.
Benzoik asit	0.20 gr.
Deiyonize su	1000 ml.

Stok olarak hazırlanan bu boya gerektiğinde 1/10 oranında sulandırılarak filtre edildikten sonra pipet yardımıyla agar plağına damlatılarak koloniler incelendi. Bu boyayla mycoplasma kolonileri merkezi kısmı koyu, periferik kısmı açık olmak üzere iki belirgin zon halinde görüldü.

Kanlı agar besiyeri:

Adi jeloza %7 defibrine at kanı ilavesi ile hazırlandı. Adi jeloz otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra 45°C'ye kadar soğutuldu ve kan ilave edildi. Daha sonra 8 cm. çaplı petri kutularına 15 cc. kadar dökülerek kullanılabildiği kadar +4°C'de bekletildi.

İdentifikasyonu yapılan Mycoplasma hominis suşları bu besiyerinde hemoliz zonu oluşturmamaktadır.

HÜCRE LİZİS'i ve MEMBRAN İZOLASYONU

Materyaller:

Logaritmik, mycoplasma sıvı besiyeri kültürü 100-200 cc.
β-tamponu: 0.015 M. NaCl, 0.01 M. β-merkaptoetanol
0.05 M. Tuis pH 7.4 (Deiyonize suda 1/20 dilüe edilir.
0.25 M. NaCl
0.01 M. fosfat tamponu (pH 7.4) içinde hazırlanmış 0.05 M.
NaCl.
Deiyonize su
Yüksek hızlı santrifüj
37°C'de su banyosu

Prosedür:

- 1- Organizmalar 12.000 d/d.de 15 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- 2- Daha sonra organizmalar 30 cc. 0.25 M. NaCl ile 3 defa yıkanarak, 2 cc. 0.25 M. NaCl çözeltisinde yeniden süspanse edildi.
- 3- Bu karışımdaki protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi.
- 4- Hücreleri lizi etmek için, 10-20 mg/ml. hücre proteini ihtiva eden bu karışım 100 kısım deiyonize suyun bulunduğu bir tüpe aktarılarak 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 5- Daha sonra membranlar 34.000 d/d.de 30 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- 6- Toplanan membranlar 0.01 M. fosfat tamponu (pH 7.4). içinde hazırlanmış 0.05 M. NaCl ile yıkandı ve 5 ml. β-tamponu içinde yeniden süspanse edildi. Bu karışımdaki membran proteinleri de yine Lowry metoduyla belirlendi.

7- β -tamponundaki membran proteinleri kullanıllana kadar -20°C 'de saklandı.

PROTEİN MİKTAR TAYİNİNDE KULLANILAN METOD

Folin-Fenol metodu (Lowry'e göre):

1) 0.1 N. NaOH içinde hazırlanmış %2'lik Na_2CO_3 (A solusyonu)

2) %1'lik $\text{C}_4\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ } eşit hacimde karıştırılır.
%2'lik Na;K Tartarat } (B solusyonu)

3) 48 kısım A solusyonu }
2 kısım B solusyonu } (C solusyonu)

4) Folin ve Ciocalteu fenol ayıracı (BDH)
1 kısım + 1 kısım distile su (D solusyonu)

Standart Eğri hazırlanması

12.5 mg. Bovin serum Albumin (BST) +5 ml. H_2O =standart çözelti.

0.1 ml. St.Çöz. + 4.9 ml. H_2O =15 mg/ml.

0.2 ml. St.Çöz. + 4.8 ml. H_2O =30 mg/ml.

0.3 ml. St.Çöz. + 4.7 ml. H_2O =45 mg/ml.

0.4 ml. St.Çöz. + 4.6 ml. H_2O =60 mg/ml.

0.5 ml. St.Çöz. + 4.5 ml. H_2O =75 mg/ml.

Hazırlanan bu çözeltiler 280 nm.de spektrofotometrede distile suya karşı (kör olarak) okundu ve sonuç absorbans cinsinden düşey eksene yapıldı. Yatay eksene ise yukarıdaki standart konsantrasyonlar yazılarak standart eğri çıkarıldı.

Prosedür:

	<u>Kör</u>	<u>Örnek</u>
Solusyon C	3 ml.	3 ml.
Saf su	0.3 ml.	0.3 ml.

Karışım 15 dakika bekletildi ve her 2 tüpe de 0.3'er ml. D solusyonundan ilave edilip 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 640 nm. dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak protein miktarı tayini daha önce hazırlanmış olan standart eğriden okundu.

MEMBRAN PROTEİNLERİNİN ELEKTROFOREZİ

Mycoplasma membran proteinlerinin elektroforetik analizinde Laemmlinin (1970) tarif ettiği SDS (Sodyum Dodesil sulfat) ihtiva eden %10'luk PAGE (Poliakrilamid jel elektroforezi) formülasyonunu ve metodunu kullandık.

Bu çalışmada Mikrobiyoloji Anabilim Dalımızda bölüm imkanları dahilinde kendimizin imal ettiği 11x14 cm. boyutlarında çalışma aralığı olan vertikal jel aparatını kullandık.

Ekipman:

- Vertikal jel aparatı (el yapımı)
- Güç kaynağı (Gelman Hawksley England)
- Perspeks jel tarakları (el yapımı)
- 11x14 cm. cam plaklar (el yapımı)
- Kompresör (Sartorius)
- 1.5 mm. jel kalınlığı sağlayan perspeks çubukları (el yapımı).

STOK SOLUSYONLAR

1- Monomer solusyonu (%30 T. %2.7 C₆₁₈)

- Akrilamid (Sigma A-9099) 58.4 gr.
- Bis-akrilamid (Sigma M-7256) 1.6 gr.
- Distile su 200 ml.'ye tamamlandı.

Bu solüsyon kullanılana kadar karanlıkta +4°C'de saklanabilir.

2- Dağıtıcı (Separating) Jel tamponu (0.5 M. Tris, pH 8.8)

- Tris (Sigma T-1503) 36.3 gr.
- pH HCL ile 8.8'e ayarlanır.
- Distile su 200 ml.'e tamamlanır.

3- Yoğunlaştırıcı (Stacking) Jel tamponu(0.5 M. Tris, pH 6.8)

- Tris (Sigma T-1503) 3.0 gr.
- pH HCL ile 6.8'e ayarlanır.
- Distile su 50 ml.'e tamamlanır.

4- %10 SDS (Sodyum Dodesil sülfat)

- SDS (Lauril sülfat Sigma L-4509) 10 gr.
- Distile su 100 ml.'e tamamlanır.

5- İnisyator (%10 Amonyum persülfat)

- Amonyum persülfat (Sigma A-6761) 0.5 gr.
- Distile su 50 ml.'e tamamlanır.

6- Numune tamponu

(0.125 M. tris, pH 6.8, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkapttoetanol)

- Tris 2.5 ml. solusyon (3)
- SDS 4.0 ml. solusyon (4)
- Gliserol 2.0 ml.
- 2-merkapttoetanol (Merck) 1.0 ml.
- Brom fenol mavisi (%0.5) 0.5 ml.
- Distile su 10 ml.'ye tamamlanır.

7- Elektrod tamponu

(0,05 M. Tris, 0.38 M. Glisin, %1 SDS)

- Tris 12 gr.

- Glisin 57.6 gr.
- SDS 2.0 gr.

8- Stok boya

(%1 Coomassie Blue R-250)

- Coomassie Blue (Sigma B-0149) 1 gr.
- Distile su 100 ml.'e tamamlanır.

9- Boya solusyonu

(%0.1 Coomassie Blue, %50 metanol, %10 asetik asit)

- Coomassie Blue (Stok) 31.25 ml.
- Metanol (Merck) 125 ml.
- Asetik asit 25 ml.
- Distile su 250 ml.'e tamamlanır.

10- Dekolorasyon solusyonu I

(%50 metanol, %10 asetik asit)

- Metanol (Merck) 125 ml.
- Asetik asit 25 ml.
- Distile su 250 ml.'e tamamlanır.

11- Dekolorasyon solusyonu II

(%5 metanol, %7 asetik asit)

- Metanol (Merck) 5 ml.
- Asetik asit 7 ml.
- Distile su 100 ml.'e tamamlanır.

Prosedür:

1- Önce elektroforeze tabi tutulacak numuneler (membran proteinleri ve standart molekül ağırlıklı proteinler) numune tamponu ile eşit miktarlarda karıştırılarak 95-100°C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Ayrıca jel formu oluşturacak cam plaklar birbirleriyle birleştirilip kenarları silikon bantlarla kapatılıp klipslerle tesbit edilerek vertikal pozisyonda işlev görececek bir elektroforez kaseti meydana getirildi (Resim-1).

2- Daha sonra 250 ml.'lik bir Buchner erleni içerisinde %10'luk jel oluşturmak için aşağıdaki formülasyon hazırlandı.

- Tris/HCl (pH 8.8) 8 ml.
- Distile su 18.1 ml.
- Stok akrilamid 13.1 ml.
- %10 SDS 0.4 ml.
- Amonyum persülfat (%10) 0.2 ml.

Bu solusyon kompresor (sartorius) ile sağlanan negatif basınç (vakum) altında yaklaşık 30 saniye karıştırıldı.

3- Vakum ile hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra solusyona 20 µl. TEMED (Sigma) ilave edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra bu solusyon dikkatli bir şekilde içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde cam kaset'e boşaltılarak üzeri bir pastör pipeti kullanılarak distile su ile kapatıldı ve 30 dakika polimerizasyona bırakıldı.

4- Bu sırada yoğunlaştırıcı (stacking) jel solusyonu aşağıdaki formülasyona göre hazırlandı.

- Tris/HCl (pH 6.8) 1 ml.
- Distile su 7.5 ml.
- Stok akrilamid 1.35 ml.
- %10 SDS 0.1 ml.
- Amonyum persülfat (%10) 0.05 ml.

Hazırlanan bu solusyon daha önceki gibi vakum altında karıştırıldı.

I. jelin (separating jel) polimerizasyonundan sonra bu jelin üzerindeki distile su dökülerek II.jel solusyonunun 1-2 ml.'si ile jelin yüzeyi 2 defa yıkandı.

5- Daha sonra II.jel solusyonuna 15 µl. TEMED ilave edilerek jel kasetine boşaltıldı. Bu jel solüsyonu üzerine içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel tarağı dikkatle yerleştirilerek üzeri distile su ile kapatılıp

yaklaşık 30 dakika polimerizasyona bırakıldı.

6- Polimerizasyondan sonra jel tarağı dikkatle çıkarılarak açılan kuyular elektrod tamponuyla yıkandı.

7- Jel kasedi, elektroforez tankın'a yerleştirilip alt ve üst tanklar elektrod tamponu ile dolduruldu.

8- Daha sonra numune maddelerin aplikasyonu yapıldı. Bu amaçla birinci kuyuya 20 µl. standard molekül ağırlıklı protein karışımı (sigma SDS-6), diğer kuyulara membran protein numunelerinden 70'er µl. applike edildi.

9- Güç kaynağı 30 mA akım şiddetine ayarlanarak elektroforez işlemi başlatıldı (Resim-2).

10- Elektroforez işlemi, numune tamponunda bulunan brom fenol mavisinin jelin alt ucuna 1 cm. kalıncaya kadar göç etmesine dek sürdürüldü (yaklaşık 4 saat).

11- Bu süre sonunda elektroforez işlemi durduruldu ve cam kaset tanktan çıkarılarak açıldı.

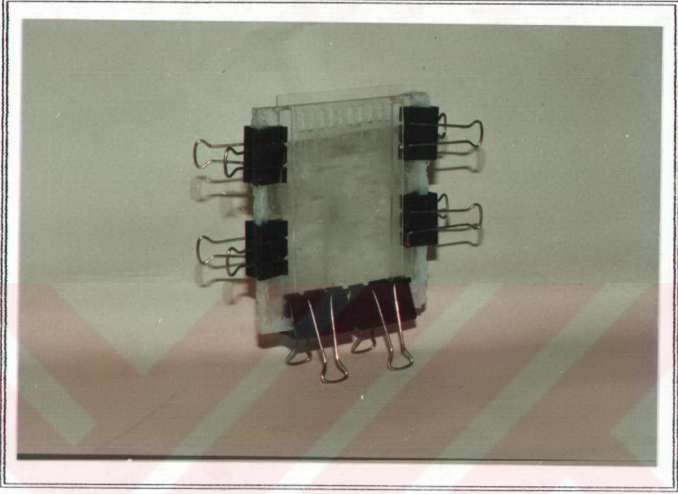
12- Kasetten çıkarılan jel dekolorant solusyonu I ile 2 saat tesbit edildi.

13- Daha sonra boyama solusyonuna aktarılarak burada bir gece rotatarda çalkalanarak boyandı.

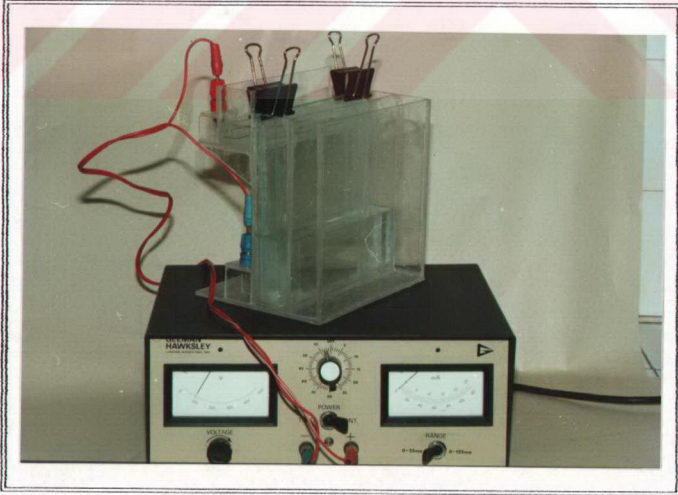
14- Boyanan jel dekolorasyon solusyonu I'e aktarılarak uygun bir zemin rengi elde edilene kadar fazla boyalardan arındırıldı.

15- Bantlar, belirgin hale geldiğinde, jel dekolorant solusyon II'nin bulunduğu bir küvete aktarılarak bu solusyonda 1 saat tutuldu.

16- Jel kurutucumuz olmadığından molekül ağırlığı hesaplamalarından sonra jel yine bu II. dekolorant solusyonunda muhafaza edildi.



Resim-1. Jel kasedi.



Resim-2. Elektroforez işleminin yapılışı.

İMMUNOBLOTLAMA (immunoblotting)

Ekipmanlar:

- Elektroforetik transblot ünitesi (Sartoblot II S-sartorius)
- Güç kaynağı (Gelman-Hawksley)
- Petri kutuları, tüpler
- Nitrosellüloz filtresi

Cözeltiler:

1. Transfer tamponu

(20 mM Tris, 150 mM glisin, %20 metanol, pH 8.3)

- Tris 1.120 gr.
- Glisin 5.125 gr.
- Metanol 100 ml.
- 500 ml'e kadar distile suyla tamamlandı.

2. Protein boyası

- Metanol içinde %0.01 Amido black 5 kısım
- Asetik asit 1 kısım
- Distile su 1 kısım

3. Dekolorant

- Metanol 90 kısım
- Asetik asit 2 kısım
- Distile su 100 kısım

4. Fosfat-tuz tamponu (PBS)+Tween:

- NaCl 8 gr.
- KCl 0.2 gr.
- Na₂HPO₄ 1.15 gr.
- KH₂PO₄ 0.2 gr.
- Tween 80 0.5 ml.

(distile su ile 1 lt.'ye tamamlandı).

- 5. PBS içerisinde hazırlanmış %2 Tween 80

6- Primer antikor solusyonu

İmmunize edilmiş tavşandan aldığımız serumu, içinde %2 polietilen glikol 6000 (merck) ve %0.05 Nonidet NP-40 (sigma) bulunan PBS ile 1/400 oranında sulandırdık. Hasta serumu da aynı şekilde hazırlandı.

7- Sekunder antikor solusyonu

Keçi, anti-tavşan IgM peroksidaz konjuge (The binding Site 63047B) serumu, içinde %2 polietilen glikol 6000 ve %0.05 Nonidet NP-40 bulunan PBS ile 1/1000 oranında sulandırdık. Hasta serumuna karşı sekunder antikor olarak kullanılan anti-Human IgM peroksidaz konjuge (The binding site G 62999 A) antiserumda aynı şekilde hazırlandı.

8- Enzim substratı

Antikoron boyanması için 3-amino-9-etilkarbazol (aldrich 10.63870) kullandık.

Stok solusyon: Aseton içerisinde %1'lik 3-amino-9-etil karbazol

- Stok solusyon 0.8 ml.
- 0.05 M. sodyum asetat tamponu, pH 5.0 .. 20.0 ml.
- %30 Hidrojen peroksit 10.0 µl.

Bu substrat kırmızı-kahverengi arası bir renk depositi vermektedir.

Prosedür

Proteinlerin nitrosellüloz membrana transferinden önce, daha evvel de açıklandığı gibi SDS-PAGE yapıldı. Bu elektroforezde jel'de 10 adet kuyu açılıp ilk beş kuyuya 1. sıraya standart molekül ağırlıklı proteinlerden 20 µl., 2., 3., 4. ve 5. sıraya 70'er µl. membran proteini aplike edildi. Jelin 2. yarısına da 6. sıraya yine standart molekül ağırlıklı proteinlerden 20 µl. 7., 8., 9. ve 10. sıralara da membran proteinlerinden aplike edilip yaklaşık 4 saat elektroforeze tabi tutuldu.

Elektroforezden sonra cam kaset açılarak jel çıkarıldı. Kenarları keskin bir bistüri ile kesildikten sonra elektroblotlama işlemine geçildi.

Elektroblotlama

1- Jel ile aynı ölçülerde 3 adet Whatman 3 numara filtre kağıdı kesilerek içinde 20 ml. kadar transfer tamponu bulunan bir petri kutusunda bu tampon ile iyice ıslatıldı.

2- Daha sonra bu 3 adet filtre kağıdı elektrotransblot ünitesinin katod kısmına yerleştirildi.

3- Jel de transblot tamponu ile yıkandıktan sonra filtre kağıtlarının üzerine arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice yerleştirildi.

4- Jel ile aynı ölçülerde olacak şekilde bir parça nitrosellüloz membranı bistüri ile kesildikten sonra petri kutusunda bulunan transblot tamponu ile iyice ıslatıldı.

5- Daha sonra jel üzerine arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice yerleştirildi.

6- Nitrosellüloz membranıyla aynı ölçülerde 3 adet Whatman 3 numara filtre kağıdı kesildi ve bu filtrelerde daha önceki gibi transblot tamponuyla ıslatılarak nitrosellüloz membranı üzerine dikkatli bir şekilde yerleştirildi.

7- Transblot ünitesinin anod kutbunu taşıyan kapak dikkatlice filtre-jel-membran-filtre sandviç sistemi üzerine yerleştirildi ve güç kaynağından sağlanan 10 mA'lık akım şiddetinde 1 saat muamele edildi (Resim-3).

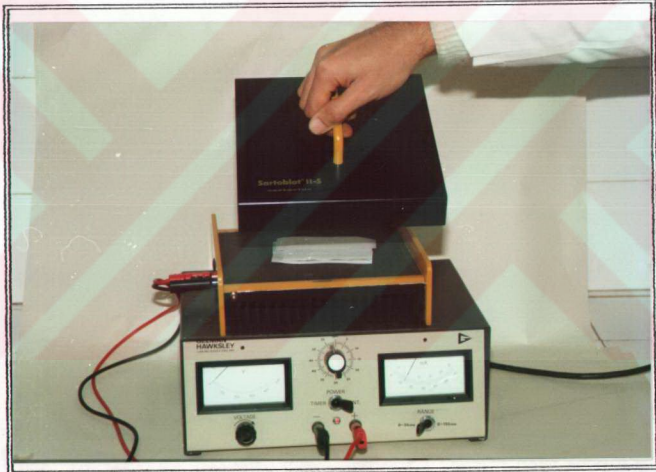
Bir saatlik transfer işleminden sonra nitrosellüloz membranı çıkarıldı ve 2 farklı analitik metod ile incelendi. Bu amaçla nitrosellüloz membran tam ortadan ikiye kesildi ve membranın bir kısmı protein boyası ile direkt olarak boyandı diğer kısmı ise immunoşimik olarak analiz edildi.

A) Membranın protein boyası ile boyanması

1- Kesilen membranın ilk yarısı, içinde amidoblack

protein boyası bulunan bir petri kutusuna aktarıldı ve burada membranın rengi boya solusyonunun rengine dönüşüncüye kadar (yaklaşık 10 dakika) bekletildi.

2- Daha sonra bu membran, içinde dekolorant solusyon ihtiva eden diğer bir petri kutusuna aktarılıp rotatorda çalkalanarak uygun bir zemin rengi (beyaz-gri) elde edilene kadar, dekolorant solusyonu 2 kez değiştirilerek muamele edildi



Resim-3. Elektroforetik transblot işleminin yapılışı.

3- Protein bantları istenilen belirginlikte açığa çıktıktan sonra membran dekolorant solusyondan çıkarılarak 2 filtre kağıdı arasında kurutuldu.

B) Membranın immunosimik analizi:

1- Kesilen nitrosellüloz membranın ikinci yarısı,

içinde %2 Tween solusyonu bulunan (yaklaşık 20 ml.) bir petri kutusuna konuldu ve bu solusyonda 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

2- Daha sonra Tween solusyonu dökülerek 20 ml. primer antikor solusyonu petri kutusuna ilave edildi. Nitrosellüloz membranı bu solusyonda bir gece 37°C'de inkübe edildi.

3- Primer antikor solusyonu dökülerek nitrosellüloz membranı PBS-Tween solusyonuyla 5'er dakikalık peryotlarla 4 kez yıkandı.

4- Daha sonra membran 20 ml. sekonder antikor solusyonu ile 30 dakika rotatorda çalkalanarak inkübe edildi.

5- Sekonder antikor solüsyonu döküldü ve membran, daha önceki gibi PBS-Tween solüsyonuyla 4x5 dakika yıkandı.

6- Nitrosellüloz membranı, enzim substratı için kullanılan tampon ile 5 dakika yıkandı.

7- Bu tampon döküldü ve taze hazırlanmış substrat solusyonu membran üzerine ilave edildi.

8- Renkli bantlar belirinceye kadar petri kutusu rotatorda çalkalandı. Belirgin bantlar meydana geldiğinde substrat solusyonu dökülerek reaksiyon distile su ile durduruldu.

9- Daha sonra membran 2 filtre kağıdı arasına konularak kurutuldu.

Bundan sonraki aşamalarda direkt boyanmış nitrosellüloz membranı ve immunoşimik olarak boyanmış nitrosellüloz membranı üzerinde belirmiş olan major protein bantları değerlendirilerek molekül ağırlığı hesaplamaları yapıldı.

JELDE DAĞILIM GÖSTEREN PROTEİNLERİN MOLEKÜL AĞIRLIKLARININ HESAPLANMASI

Bu amaç için ticari olarak temin edilebilen standart molekül ağırlıklı proteinler kullanılır.

Bu proteinleri tek tek veya set halinde temin etmek mümkündür. Bizim çalışmamızda SDS-6 Dalton mark VI (Sigma)

ve SDS-7B (Sigma) standart protein karışımlarını kullandık.

Jelde dağılım göstermiş proteinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanmasında standart proteinler ile bilinmeyen proteinler tamamen aynı şartlarda aynı jel konsantrasyonunda elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez süreci sonunda bilinen proteinlerin jelde oluşturmuş oldukları bantların anottan olan uzaklıkları ve elektroforez uzunluğu ölçülerek bilinen her bir proteinin Rf (relatif mobilite) değerleri hesaplandı. Rf değeri proteinlerin anottan olan uzaklıkları ile elektroforez uzunluğunun oranı olarak hesaplanmaktadır.

$$Rf = \frac{\text{Protein migrasyon Uzunluğu}}{\text{Elektroforez Uzunluğu}}$$

Bu şekilde bulunan her bir proteinin Rf değeri bir semi-logaritmik grafik kağıdının absis eksenine işaretlendi. Grafik kağıdının ordinat eksenine ise her bir bilinen proteinin molekül ağırlıkları işaretlendi. Daha sonra molekül ağırlıkları ve Rf değerlerinin çakıştığı noktalar birleştirilerek bir kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Bu standart eğri yardımıyla bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlıkları da Rf değerlerinin ölçülmesiyle grafikte yerine konularak hesaplandı.

Standart molekül ağırlıklı protein karışımları liyofilize halde bulunmakta olup 0.5 cc. 8 M. üre ve 0.5 cc. numune tamponu ilave edilerek eritildiler. Elektroforezden önce 5 dakika 100°C su banyosunda kaynatıldı ve 20 µl. aplike edildi.

Kullanılmadan önce her defasında kaynatma işlemi yapıldı ve kullanılmadığı zamanlarda -20°C'de dondurularak saklandı.

BULGULAR

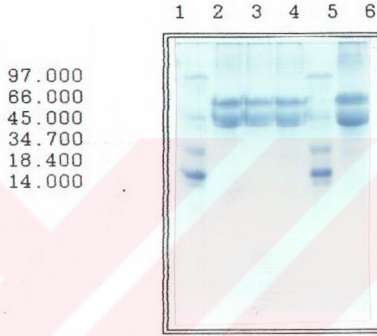
Kadınların genitoüriner sistem enfeksiyonları ile M.hominis kolonizasyonu arasındaki ilişki ile izole edilen suşların protein antijenleri ve kolonize konakta meydana gelen muhtemel immun cevabın antijenik profilini tespit etmek amacı ile planlanan çalışmada servikovajinal sürüntü örnekleri değerlendirilen 55 kadından 5 (%9.09)'inde Mycoplasma türleri izole edilmiştir. İzolman suşların hemolitik ve fermentatif özelliklerine göre yapılan identifikasyonda suşlardan 4 (%80) ünün M.hominis 1(%20)'inin de M.fermentans olduğu görülmüştür (Tablo-3).

Tablo-3.

Vak'a sayısı	izolman türü				Toplam
	M.hominis		M.fermentans		
	Sayı	%	Sayı	%	
55	4	7.27	1	1.81	5

M.hominis olarak identifiye edilen suşların sıvı çoğaltma vasatlarına pasajları yapılarak bol miktarda üretilmesi sağlanmış, buradan elde edilen suşların protein antijenlerinin profilleri ve molekül ağırlıklarının tespiti için uygulanan SDS-PAGE tekniği ile mikroorganizmanın molekül ağırlığı 10.000 ile 150.000 dalton arasında değişen belirgin 25 band oluşturduğu görülmüştür. Bu protein

bantlarından 4 tanesinin bütün suşlarda ortak ve en belirgin bantlar olduğu tespit edilmiştir. Bu bantlar marker protein bantları ile karşılaştırılmış ve molekül ağırlıklarının sırası ile yaklaşık 35.000-38.000, 42.000 ve 45.000 dalton ağırlığında olduğu görülmüştür (Resim-4).

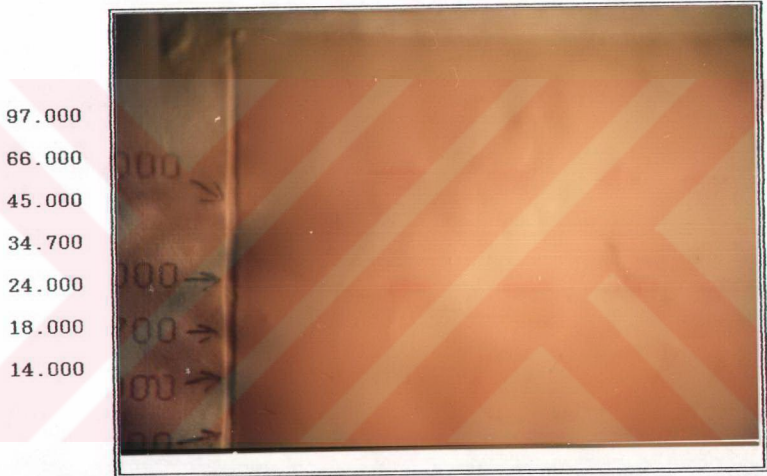


Resim-4. 1 ve 5. kolonlarda marker proteinler, 2,3,4 ve 6. kolonlarda ise *M. hominis* membran proteinleri görülmektedir (%10'luk SDS-Poliakrilamid jelinde, Comassie B. blue ile yapılan boyama işlemi sonunda).

SDS-PAGE için hazırlanan ve protein miktarı bilinen antijen örneklerinden 2'şer deney hayvanına ip yolla birer hafta ara ile iki doz enjeksiyon yapılmış ve son enjeksiyondan 3 hafta sonra venöz kan örnekleri toplanarak kontrol olarak kullanılmıştır.

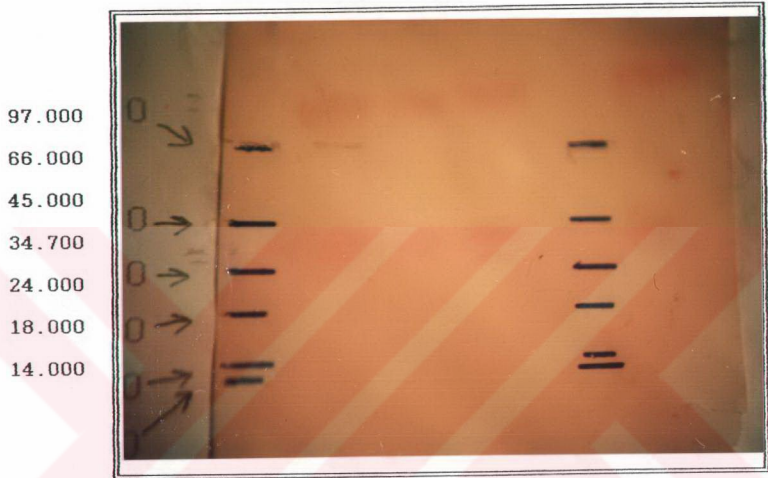
SDS-PAGE metodu ile antijenlerin migrasyonel differansiyonu sağlanmış ve oluşan protein bantlar elektriki ortamda nitrosellülöz membranlara blotlanmıştır. Bu blot'larla gerek *Mycoplasma* izole edilen 4 hastanın serumlarında kendi izolman suşlarına, gerekse diğer izolmanlara karşı antikor cevabı ile kolonizasyon tespit edilemeyen 4 vak'aaya ait serum örneklerinde tüm izolmanlara karşı muhtemel antikor cevabı araştırılmıştır. Westernblot olarak ta bilinen bu teknikle kolonize olan hastaların

4'ünün serum örneklerinde 110.000, 97.000 ve 42.000 daltonluk bantlara karşı cevap alınmış, mikroorganizma izole edilen bir vak'a ile kontrol olarak kullanılan ve bakteri izolasyonu yapılamayan 10 vak'anın serum örnekleri ile hiçbir bantın boyanmadığı görülmüştür (Resim-5).



Resim-5. Hasta serumları ile yapılan immunoblot deneyi (3-amino-9-etil karbazol ile immunoşimik olarak boyanmıştır).

Bir başka nitrosellülöz membranda immünize tavşan serumları ile yapılan Westenblotlamada suşlara bağımlı bir fark görülmeksizin her tavşan serumunda Mol.ağırlıkları yaklaşık 110.000, 97.000, 42.000 ve 38.000 daltonluk bantlara karşı oldukça güçlü bir antikor cevabı olduğu, bu major bantlar dışında Mol.ağırlıkları 38.000 daltondan daha düşük bazı bantlara karşı da oldukça zayıf cevap alındığı görülmüştür (Resim-6).



Resim-6. immünize tavşan serumu ile yapılan immunblot deneyi (3-amino-9-etil karbazol ile immunoşimik olarak boyanmıştır).

TARTIŞMA

Mycoplasma türlerinin genitoüriner sistemdeki kolonizasyonları ile genitoüriner sistem enfeksiyonları arasındaki ilişki uzun yıllar şüphe ile karşılanmıştır. Mikroorganizmanın izolasyonundaki güçlükler sebebi ile toplumda G.Ü.S. deki lokalizasyon sıklığı kesin olarak tespit edilememiş, bu sebeble hasta grublarında yapılan izolasyonlarda her zaman şüphe yaratmıştır.

Her ne kadar M.hominis, M.fermentans, M.genitalium ve U.urealyticum genel olarak genital mycoplasmalar olarak tanımlanmışsa da M.fermentans ve M.genitalium G.Ü.S.'de oldukça nadir olarak izole edilmektedir. Bu sebeple M.hominis ve U.urealyticum de esas genital mycoplasma türleri olarak kabul edilmektedir. Özellikle sosyoekonomik durumu düşük toplumlarda sık sık seks eşi değişimine paralel olarak genital M.hominis kolonizasyon insidansının arttığı, bunun yanısıra genitoüriner sistem enfeksiyonları ve komplikasyonu olarak görülen infertilite ile gebelik anomalilerinin yanında septik artrit, sepsis, endokardit, yara enfeksiyonları, neonatal menenjit ampiyem ve ensefalit gibi genital sistem dışı enfeksiyonlara da yol açtığı bildirilmiştir. Genital enfeksiyonlarda mikroorganizmanın vajen epitel hücre yüzeylerinde bulunan glukokonjugat yapıdaki reseptörlere bağlanarak adsorbe olduğu, hücre duyarlılığı, mikroorganizma sayısı ve lokal immunccevap farklılıklarına bağlı olarak ta patogenezin geliştiği iddia edilmiştir. Böylece M.hominis'in G.Ü.S.deki bütün

kolonizasyonlarının enfeksiyon oluşturmayaacağı, bunun şarta bağlı olduğu vurgulanmıştır.

Genital mycoplasma enfeksiyonlarının tanısında mikroorganizmaların vajen, serviks, posterior serviks ve uretral akıntı örneklerinden izolasyonu en güvenilir yol olmakla beraber gerek kültür metodlarının uygulama ve izolmanların değerlendirilmesinde, gerekse izolasyon sayısı ile enfeksiyon arasındaki spesifik korelasyonun kurulmasındaki güçlükler sebebi ile daha pratik serolojik tanı metodlarının uygulanmasına ağırlık verilmiştir. Bu maksatla IF, CF, IP, IHA ve EIA teknikleri kullanılmış, fakat bu tekniklerin de hasta serumundaki yüksek düzeyde bulunan nonspesifik antikörlerle kros reaksiyonları ayırtedememesi sebebi ile değerinin düşük olduğu görülmüştür. Nitekim yapılan çeşitli protein antijen analiz çalışmalarında özellikle M.hominis ile M.pneumoniae arasında oldukça benzer antijenik determinantların olduğu, bu sebeble de M.hominis ve M.pneumoniae enfeksiyonlarının serolojik metodlarla sağlıklı olarak değerlendirilmesinin güç olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Son yıllarda mikroorganizmaların spesifik yapı komponentlerini elektriki bir ortamda elektrik yükü ve molekül ağırlıklarına göre migrasyonal separasyona maruz bırakılıp separe olan bantların ya molekül ağırlıkları veya uygun proplar yardımı ile işaretlenip tanımlanmalarına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalarda mikroorganizmanın son derece spesifik olan DNA (Southern blot), RNA (Northern blot) ve protein (Western blot) komponentlerinin analizleri mümkün olmuştur. Protein komponentlerin SDS-PAGE'de separe edilip, nitrosellüloz asetat gibi uygun bir protein bağlayıcı solit matrikse kopyalanarak, hasta serumlarında separe olan çeşitli protein bantlara karşı spesifik antikörlerin varlığının gösterilmesi, mikroorganizmalar arasında bulunması muhtemel olan ve serolojik testlerin değerlerini düşüren kros

reaksiyonlar elimine edilmiştir.

Sasaki ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada mycoplasmalar ile birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakterinin plazma membranlarında molekül ağırlığı 42 kD ile 48 kD arasında değişen antijenik polypeptidlerin birbirine benzer şekilde ortak olarak bulunduğunu gözlemişlerdir (48). Bu araştırmacıların yapmış olduğu immunblot çalışmasında *M.fermentans*'ın 43 kD.'luk membran proteinine has olan antikorun teste tabi tutulan diğer 14 tür mycoplasma suşunun da aynı molekül ağırlığındaki membran proteinine spesiflik gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *M.hominis*'in 45 kD'luk major membran proteinine karşı spesifik olan antikorun, çalışılmış olan bazı mycoplasma türlerinin 42 kD-48 kD'luk membran proteinleriyle de kros reaksiyonlara sebebiyet verdiği gözlenmiştir (48).

Andersen ve arkadaşları immunblot metodu ile yaptıkları bir çalışmada *M.fermentans* ve *M.pneumoniae*'nin membran proteinlerinden olan 62 kD'luk polipeptide karşı oluşan spesifik antikorun *Legionella micdadei* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın yaygın antijeni ile serolojik olarak kros reaksiyon gösterdiğini gözlemişlerdir (4).

Mycoplasma türleri arasında genus ve tür içi veya diğer mikroorganizmalarla yukarıda bahsedildiği gibi kros reaksiyonların görülmesi, klasik serolojik tanı metodları için bir problem oluşturmaktadır. Diğer başka bir problem de aynı türün suşları arasında kısmi de olsa bazı protein komponent farklılıklarının mevcudiyetidir. immunblot metodu, bu protein yapı farklılıklarını ortaya çıkararak, muhtemel yanlış sonuçları da elimine etmek gibi bir avantaja sahiptir. Bu özelliği ile mikroorganizmaların sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır. Thirkell ve arkadaşları *Mycoplasma ovipneumoniae* suşları arasındaki protein komponentler ve antijenik varyasyonlarla ilgili 22 suş üzerinde yaptıkları çalışmada, her suşun yaklaşık 50'ye

yakın polipeptide sahip olduğunu, bu polipeptidlerden sadece 25-35 kD ve 50-60 kD'lık molekül ağırlığındaki proteinlerin bütün suşlarda ortak, diğerlerinin ise farklı molekül ağırlığı gösterdiğini SDS-PAGE ve immunoblot ile tespit etmişlerdir. Polyklonal antiserum kullanarak yaptıkları immunoblot testinde homolog suşların 30 ila 35 arasında antijenik polipeptide sahip olduklarını, bunların 129,119,110,105,89,84,76,72,65,56,46,44,40,35,33,32 ve 26 kD'lık olanlarının kuvvetli reaksiyon verdiklerini göstermişlerdir. 22 kD'lık antijenik polipeptidin suşlar arasında farklılıklar gösteren bir minor polipeptid olduğunu belirtmişlerdir (56).

Mycoplasma hominis'in gerek antijenik yapı komponentlerinin analizi gerekse bu komponentlerin immunodiagnostik değeri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mikroorganizmanın enfeksiyon spektrumu ile izolasyon ve identifikasyon prosedürlerinin iyi bilinmemesi, son analiz teknikleri için mikroorganizmanın iyi bir model oluşunu engellemiştir.

Sasaki ve arkadaşları SDS-PAGE tekniği ile separe ettikleri M.hominis membran proteinlerinin yaklaşık farklı molekül ağırlığında 30 band oluşturduğunu göstermişler bu bandlardan 45 kD'lık bandın diğer birçok mycoplasma türünün yanı sıra gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerde de bulunduğunu tespit etmişlerdir (48).

Liepmann ve arkadaşları M.hominis'in 102-116 kD'lık antijenik proteinlerini SDS-PAGE ve Immunoblot metodları ile analiz etmişler ve mikroorganizmanın izole edildiği hastaların serumları ile yapmış oldukları immunoblot analizlerinde bu molekül ağırlığındaki antijenik proteinlere karşı spesifik antikörlerin geliştiğini gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar 102-116 kD'lık polipeptidleri, jelden elektroelüsyon ile ayırmışlar ve ELISA prosedüründe antijen olarak kullanarak hassas ve spesifik sonuçlar elde

etmişlerdir (39).

Biz bölgemizdeki M.hominis'e bağlı G.Ü.S. enfeksiyonlarının sıklığı ve izole edilen suşlar yanında bunların protein antijenleri ile hastada oluşturdukları muhtemel immun cevabı tespit amacı ile planladığımız çalışmada 55 vajinitli hastanın 4 (%7.27) ünde M.hominis ve 1 (%1.81)inden M.fermentansı izole ettik.

Azaroğlu bölgemizde yaptığı çalışmada hasta kadınların %38.4'ünde M.hominis'i izole ederken (5), Aksöz hastaların %9.37'sinde (3), Yasdı ise %9.6'sında bu mikroorganizmayı izole etmiştir (62).

Bizim yapmış olduğumuz araştırma M.hominis'in insidansını araştırmak amacı ile planlanmış olmamakla beraber elde ettiğimiz sonuç Aksöz ve Yasdı'nın elde ettiği sonuçlar ile uyum göstermektedir.

M.hominis'in membran proteinlerinin SDS-PAGE ve immunoblot metodları ile yapmış olduğumuz analizlerinde ise bu mikroorganizmaya ait 25 belirgin polipeptid bantı elde ettik. Bu amaçla yapılan diğer çalışmalarda da 15-50 farklı polipeptid bantı elde edilmiştir (40).

M.hominis'in membran proteinlerinin SDS-PAGE analizinde izole ettiğimiz 4 M.hominis suşunun tamamında 35-45 kD.'luk bantların en belirgin boyanan major proteinler olduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar Sasaki'nin elde ettiği sonuçlar ile uyum göstermektedir.

Mikroorganizmaların izole edildiği hasta serumlarını kullanarak yapmış olduğumuz immunoblot analizinde 110,97 ve 42 kD.'luk polipeptidlere karşı antikor cevabının mevcudiyetini tesbit ettik. Tavşanların immunizasyonu sonucu elde ettiğimiz kontrol (+) serumlarla bu bantların 4.ünden net olarak boyandığı gibi ayrıca 38 kD.'dan daha küçük bazı

bantların da boyandığını gördük. Buna karşılık izolasyon yapılmayan 10 hasta serumu ile izolasyon yapılan 1 hasta serumunda bu bantlara karşı immunccevap tespit edemedik. Hasta serumları ile reaksiyona giren 110-97 ve 42 kD'lık bantlarımız Liepmann'ın aynı amaçla yapmış olduğu immunblot analizi ile elde ettiği sonuçlarla uyum göstermektedir.

Bizim bir başka gözlemimiz de immunizasyon veya tabii aktif enfeksiyonlu hastada humoral immunccevabın oluşmasını sağladığı, nonenfektiflerde kolonizasyona rağmen, enfeksiyon görülmeyenlerde primer enfeksiyonla ilişkili olmayan kolonizasyonlarda hastada humoral immunccevap oluşturmadığıdır. Bu da daha önce uzun yıllar tartışılan kolonizasyonla enfeksiyon arasındaki ilişkiyi göstermede değerli bir kriter olabilir.

SONUÇ

Mycoplasma'ların kadın G.Ü.S. enfeksiyonlarındaki sıklığı ile protein antijenlerinin yapısı ve hastadaki humoral immunc cevabın profilini tespit amacı ile yapılan çalışmada;

1- Teste tabi tutulan kadın hastaların %7.27'inden M.hominis izole edilmiştir.

2- Hastaların %1.81'inde M.fermentansın genital kolonizasyonu tespit edilmiştir.

3- M.hominis'in membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi sonucunda, molekül ağırlığı 10 kD ile 150 kD. arasında değişen, Coomassie blue ile belirgin boyanan 25 polipeptid bandı elde edilmiştir.

4- Molekül ağırlıkları 35,38,42 ve 45 kD olan 4 polipeptidin, izole edilen M.hominis'lerin 4'ünde de ortak olarak buldukları ve kuvvetli boyanma reaksiyonu göstermeleri sebebiyle de bu polipeptidlerin, bu mikroorganizmaların major membran proteinleri olduğu görülmüştür.

5- Yapılan immunoblot analizinde, mikroorganizmaların izole edildiği hastaların serumlarında M.hominis membran proteinlerinden olan 110, 97 ve 42 kD.luk polipeptidlere karşı antikörlerin geliştiği tespit edilmiştir.

6- Pozitif kontrol elde etme amacı ile mikroorganizma proteinlerine karşı immunize edilen tavşan serumu kullanılmış, immunoblot analizinde 110,97,42 ve 38 kD'den küçük diğer bazı polipeptidlere karşı da oldukça zayıf reaksiyonların gelişmiş olduğu gözlenmiştir.

7- Negatif kontrol olarak mikroorganizmanın izole edilmediği hasta serumları kullanılmış, immunoblot analizlerinde mikroorganizma membran proteinlerine karşı herhangi bir immuncevabın olmadığı tespit edilmiştir.

M.hominis'in G.Ü.S.deki kolonizasyonları ile mevcut enfeksiyon arasındaki ilişkinin desteklenmesinde, şüpheli hasta serumlarında mikroorganizmanın major protein komponentlerine karşı gelişen spesifik immuncevabın westernblot analizi ile gösterilmesi faydalı olacaktır. Pilot çalışma mahiyetinde yapılan bu çalışma daha geniş grublarda tekrarlanması ile spesifitesi güvenilir, sensitivitesi yüksek ve klinikle korele immunblot tekniğinin yaygın bir tanı metodu olarak kullanılması mümkün olacaktır.

ÖZET

Mycoplasma hominis'in kadınlarda genitoüriner sistem enfeksiyonlarındaki insidans ile izole edilen mikroorganizmaların antijenik yapı ve sebep oldukları humoral immunc cevabın tesbiti amacı ile planlanan bu çalışmaya 18.2.1992-30.7.1992 tarihleri arasında Ç.Ü.Tıp Fakültesi Balcalı hastanesi Kadın Hastalıkları polikliniğine müracaat eden vajinit tanılı 55 hastadan alınan vajen sürüntüleri ve idrar örnekleri ile venöz kan örnekleri izolasyon, elektroforetik ve immünoşimik metodlarla incelenmiştir.

Bu çalışmada kadınların 4 (%7.27)'ünden M.hominis, 1 (%1.81)inden M.fermentans izole edilmiştir. izole edilen 4 M.hominis'in membran protein komponentleri ve antijenik özellik gösteren polipeptidleri SDS-PAGE ve immunblot metodları ile analiz edilmiş, analiz sonunda mikroorganizmaya ait 25 belirgin polipeptid bant tespit edilmiştir. Hasta serumu ve immun serum kullanılarak yapılan immunoblot deneyinde antijenik oldukları belirlenen 110, 97 ve 47 kD.'luk 3 antijenik polipeptid'in varlığı belirlenmiştir. Kontrol amacı ile mikroorganizmanın proteinleri ile immunize edilmiş tavşan serumunun kullanıldığı immunoblot deneyi sonucunda ise yukarıda bildirilen molekül ağırlığındaki bantlar yanında 38 kD.'luk bir antijenik bant ile molekül ağırlığı 38 kD.'dan daha küçük olan ve kısmi reaksiyonlar gösteren değişik molekül ağırlıklarında polipeptid bantları da tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Akan E., Tıbbi Mikrobiyoloji, Oba Basımevi-Konya, 430-44, 1986
- 2- Ahrens P., Frlis N.F., identification of Mycoplasma hyopneumoniae with a DNA probe, Letters in Applied Microbiology, 12, 249-253, 1991
- 3- Aksöz T., Bölgemizde görülen vajina enfeksiyonlarında izole edilen mikroorganizmalar. Ç.Ü.Tıp Fakül. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1989.
- 4- Andersen J.S., Jensen S.J., Heat-Shock protein in Mycoplasma pneumoniae shown by immunoblotting to be Related to the Bacterial Common Antigen, The Journal of infectious. Diseases 161: 1039-1040, 1990
- 5- Andersen, H., Birkelund S., Christiansen, G., Electrophoretic analysis of proteins from Mycoplasma hominis strains detected by SDS-PAGE: two dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. S.Gen.Microbiol., 133:181-191, 1987
- 6- Azaroğlu İ., Kadın Genito-üriner sistem enfeksiyonlarında mycoplasmalar ve diğer mikroorganizmaların rolü. Ç.Ü.Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık tezi, 1986

7- Barker C.E., et al., Evaluation of Serodia Myco II. particle Agglutination Test for Detecting Mycoplasma kpneumoniae Antibody; comparison with μ -capture ELISA and immuno-flourescence. J.Clin. Pathol. 43:163-165, 1990

8- Bernet C., et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the Polymerase Chain Reaction. J.Clin. Microbiol. 27:2492-2496, 1989

9- Bilgehan H., Mycoplasma Enfeksiyonlarında serolojik tanı, Klinik Mikrobiyoloji. Tam Barış Yayınları, 1.Baskı 559-560, 1992

10- Bergman S.M., idarrison H.R., Boyle W.T., Haffner W.J., Low Birth weight, Prematurity and postportum endometritis. Association with prenatal cervical Mycoplasma hominis and Chlamydia trachomatis infections. JAMA. 257:1189-1194, 1987

11- Bordier C.; Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J.Biol. Chem. 256:1604-1607, 1981

12- Bölske G., Strondberg M.; Species spesific antigens of Mycoplasma hyopneumoniae and cross-reactions with other porcine mycoplasmas. Current Microbiology 15, 233-239, 1987

13- Brendt M.D., Feldnar J., Kahane I., Mycoplasma Attachmen to solid surfaces: A review The Yale J.Biol. Med. 56:653-656, 1983

14- Blazek R., idodding U., Kraft U., Fast and simple procedure for the detection of cell culture mycoplasma using a single monoclonal antibody, J.immünol. Methods, 131:203-212, 1990

15- Burnett W., Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS. Polyacrylamide Gels to unmodified nitrocellulose. Anal. Biochem. 112: 195-203, 1981

16- Cassell G.H., et al. Incidence of genital mycoplasmas in women at the time of diagnostic laparoscopy. *The Yale J. Bio. Med.* 56:557-563, 1983

17- Cleveland D.W., Fisher S.G., Kirshner M.W., Laemmli U.K., Peptide mapping by limited proteolysis in SDS and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102, 1972

18- Costar M., Leach R.H., Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the mycoplasma mycoides cluster. *J. Gen. Microbiol.* 133:3318-3329, 1987

19- Daniels M.J., Meddins B.M., Polyacrylamide gel electrophoresis of mycoplasma proteins in Sodium dodecyl sulfate, *J. Gen. Microbiol.*, 76:239-242, 1973

20- Deodhar L., Isolation of *Achole plasma laidlawii* from the female genital tract. *Recent. Ad. Mycopl.* 732-733, 1988

21- Dinsmoor M.J., Ramamurthy R.S. Transmission of genital mycoplasmas from mother to neonate in women with prolonged membrane rupture. *Pediatr. infect. Dis. J.* 8:483-487, 1989

22- Dinsmoor M.J., Ramamurthy R.S., Cassel G.H., Neonatal serologic response at birth to the genital mycoplasmas. *Pediatr. infect. Dis. J.* 8: 487-491, 1989

23- Davis R.H. Quantitation of stained proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 58, 615, 1974

24- Friberg J., Genorpe H., Mycoplasma and human reproductive failure. III. Pregnancies in "infertile" couples treated with doxycycline for mycoplasmas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 116-120, 1973

25- Gibbs R.S., Blans J.D., Clair Y.S. Costenade Mycoplasma hominis and intrauterin infection in late pregnancy. sex. Trans. Dis. 10: 303-306, 1983

26- Gobel M.D., Supramoleculer sutructure in Mycoplasmas. The Yale. J.Biol. Med. 56: 695-700, 1983

27- Hyman, H.C., Yogev D., DNA prober for detection and identification of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium. Journal of Clin. Microbiol. 25, 726-728, 1987

28- Johnstone A., Thorpe R. Polyoerylamide Gel Techiques. Immunochemtstry in Practice. Third ed. Blackwell Scientific Publication. 148-180, 1987

29- Johnstone A., Thorpe R., Detection and Measurement of proteins. Immunochemistry in practice. Third ed. Blackwell scientific Publication. 1-29, 1987

30- Johnstone A., Thorpe R., Spesifik detection of antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis. Immunochemistry in practice. Third. ed., Blackwell scientific Publication. 183-199, 1987

31- Kanamoto Y., Nakano H., Sumii T., Colonisation with genital mycoplasmas in pregnant women and their neonates and birth weight zentralbl. Bacterial. Microbiol. Hyg. A. 265:263-267, 1987

32- Kagawa H., Methods in Membrane Biology vol.1, Plenum Press. New York and London, 1974

33- Knudson, K.A. Proteins transfered to nitrosellulose for use as immunogenes. Anal. Biochem. 147:285-288, 1985

34- Krohn M.A., Hiller S.L., Eschanbach D.A. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginasis among pregnant women. J.Clin. Microbiol. 27:1266-1272, 1989

35- Kundsine R.B. Genital mycoplasmosis in man. The New England J.Med. 16. 1970

36- Kundsine R.B., Briscoe J.E., Pelletier P.A. U.urealyticum incriminated in perinatal morbidity and mortality. Science 21324, 474-476, 1981

37- Kundsine R.B., Driscoll S.G., Monson R.R. Association of U.ureolyticum in the placenta with perinatal morb. and mortality. New Eng. J.Med. 3105, 941-945, 1984

38- Lee H.Y. McCormae M.W. The genital mycoplasmas. Pediatric Clinics of North America. 21, 1974

39- Liepmann M.F., Gireaudot P., Deletrez J. Use of the Mycoplasma hominis 102-116 KD proteins as antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. Microbio. 65(262), 7-13, 1991

40- Maddy A.H. Biochemical Analysis of membranes. John. Willey and Sons. inc. New York. 1976

41- Mc Mahon D.K., Dummer J.S., Pasculle A.W., Extragenital Mycoplasma hominis infections in adults. Am. J.Med. 89: 275-281, 1990

42- Mouches C., Landresse T., McGarrry G.J. Analysis of spiroplasma proteins. Contribution to the taxonomy of Group IV. Spiroplasma and the Characterization of spiroplasma Proteins. Antigens. The Yale J.Biol. Med. 56:431-437, 1983

43- Rasin S., Tully J.G. Methods in Mycoplasmaology Vol.1. Academic Press. New York. 1983

44- Rasin S., Tully J.G. Methods in Mycoplasmaology Vol.2 Academic Press. New York, 1983

45- Reurpen, A., Marlius J., Hartmann A.A., Transfusion rate of U.urealyticum, Mycoplasma SPP., Gardnerella

vaginalis, β streptococci, Candida SPP and Chlamydia trachomatis from the mother to the new born, Arch. Gynecol. Obst. 241:165-170, 1987

46- Romero R., Mazor M., Oyorsun E., Is genital colonisation with M.hominis or U.urealyticum associated with prematurity/low birth weight. Obstet. Gynecol. 73:532-536, 1989

47- Rottem S., Shirvan M.S., Grass P.D. Phare separation, Ion Permeabilits, and the isolation of membranes from osmotically stabile mycoplasmos. The Yale, J.Biol. Med. 56:405-411, 1983

48- Saraki T., Evidence that Mycoplasmas, Gram-negative Bacteria and Certain Gram-positive Bacteria Share a similar protein antigen, J.Bacteriol. 2398-2400, 1991

49- Sasaki T., Bonissol B., Ho K., Demonstration of cross-reactive antibodies to mycoplasmas in human sera by ELISA and immunoblotting. Microbiol. immunobiol. 31: 639-648, 1987

50- Soneher P.J., Regan J.A., Uretrical transmission of U.urealyticum in full term infants. Pediatr. infect. Dis. J. 6:825-828, 1987

51- Smith P.F., The biology of Mycoplasmas, Academic. Press. New York. London, 1971

52- Styler M., Shopior S.S., Mollicules (Mycoplasma) in infertility. Fertil. Steril. 55:1, 170-176, 1971

53-Talkingon D.F., Dovts J.K., Lonupp K.L., Garret B.K. The effects of three serotypes of U.urealyticum on spermatozoal motility and penetration in-vitro. Fertil. Steril, 55:170-176, 1991.

54-Taylor-Robinson D., McCormack W.M. The genital

mycoplasmas, New Eng. J.Med. 302:18, 1003-1010, 1980.

55-Taylor-Robinson D., McCormack W.M. The genital mycoplasmas, New. Eng.J.Med. 302:19, 1063-1067,1980.

56-Thirkell D., Spoonen R.K. Polypeptide and Antigenic variability Among Strains of Mycoplasma ovipneumoniae demonstrated by SDS-PAGE and Immunoblotting. Veterinary Microbiol. 21:241-254, 1990.

57-towbin H., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Academic science USA, 76:4350-4354, 1979.

58-Towbin H., Stachelin T., Gordon J. Immunoblotting and hot immunobinding current status and outlook, J.Immunol.Meth. 72:313-340, 1984.

59-Waites K.B., Cassel G.H. Genital mycoplasma infections in neonates. J.Pediat. 112:1, 167-168, 1988.

60-Waites K.B., Lrouse D.T., Cassel G.H. Ureaplasma and mycoplasma CNS infections in newborn babies. The Lancet, 335:658-659, 1990.

61-Weber K. Measurements of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamide gels. Methods in Enzymology. 25:3-27, 1972.

62-Yasdı H., Çukurova bölgesindeki asemptomatik kadınlarda normal vajen florasının incelenmesi. Ç.Ü.Tıp Fakül. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bilim Uzmanlığı Tezi, 1992