

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

79477

**KLİNİK ÖRNEKLERDE NEISSERIA  
GONORRHOEAE'NİN POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU (PZR) İLE SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

**Dr. N. Fulya İLHAN**

F.Ü TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

79477

DANIŞMAN

**Doç. Dr. M. Ziya DOYMAZ**

S.G. YÜK SEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ELAZIĞ-1998

## İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ VE AMAÇ-----	1
2-GENEL BİLGİLER-----	4
3-GEREÇ-----	25
4-YÖNTEM-----	27
5-BULGULAR-----	33
6-TARTIŞMA-----	39
7-SONUÇ-----	50
8-KAYNAKLAR-----	51
9-ÖZET-----	56
10-SUMMARY-----	57
11-ÖZGEÇMİŞ-----	58
12-TEŞEKKÜR-----	59

## GİRİŞ VE AMAÇ

Gonore (Bel soğukluğu) bilinen en eski hastalıklardan birisidir, hastalık cinsel temas veya perinatal yolla geçmektedir. Tedavi edilmemiş enfeksiyonlar birkaç hafta veya ay içerisinde spontan olarak iyileşebilmektedir ancak, bunun yanı sıra tekrarlayan enfeksiyonları da sıklıkla. Kadın hastalarda assendan enfeksiyon dünyada kadın infertilitesinin en yaygın sebeplerinden olan akut salpenjit komplikasyonuna neden olur (12).

Gonorenin bu tarz önemli komplikasyonlarından korunabilmek ve toplumda enfeksiyon sıklığını azaltmak için hastalığın doğru ve hızlı tanısı önemlidir. Bilindiği gibi gonore tanısında üretral ve servikal akıntı örneklerinden hazırlanan Gram boyalı direkt preparatların tanı değeri yüksektir. Lökositlerde intrastoplazmik ve ekstrasellüler olarak görünen Gram olumsuz diplokoklar özellikle erkeklerde genital akıntılardan hazırlanan preparatlarda tanı koydurucudur.

Ancak ürogenital bölge gibi floralı bölgelerden yapılan ekimlerde tanı için selektif besiyerlerinin kullanılması daha uygun olmaktadır. Hızlı ve doğru tanı için kültür yönteminde bazı problemler vardır (29,30).

1-Özellikle organizmadan yeni ayrıldığında gonokoklar üreme bakımından oldukça güçlü gösterir.

2-Gonokok kuruluğa dayanıksızdır ve hasta örnekleri acilen uygun ortama ekilmelidir. Bu nedenle uygunsuz inkubasyon ve transport ortamında organizma canlılığını yitirmektedir.

3-Normalde yüksek konsantrasyonlarda saprofitik mikroorganizma içeren bölgelerden gonokokun izolasyonu zordur.

4-Bazı gonokok türleri besiyeri ortamında bulunan antibiyotikler veya diğer maddeler tarafından inhibe edilmektedir.

5-Antibiyotik tedavisi başlanmışsa kültür duyarlılığı azalmaktadır

6-Ani ısı değişikliklerinden özellikle de soğuktan ve atmosferdeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki azalmadan etkilenir.

7-Kesin identifikasyon için gerekli olan saf kültür eldesi ve sonuç alınması 24-72 saat sürmektedir.

Kültür ile izolasyon tanısal standart olup pratik olduğu sürece kullanılmalıdır denilse de özellikle uzun inkübasyon süresi gerektirdiğinden kültüre dayalı olmayan tanısal destekli testlerde yararlı olabilir. Bu testler arasında; poliklonal antigonokokkal antikorlu enzim immunoassay, radioimmunoassay (RIA), gonokokkal DNA belirlemede genetik problemler ve daha güncel olarak da PCR (Polymerase chain reaction) veya LCR (Ligase chain reaction) ile DNA amplifikasyonu sayılabilir. Bunlardan özellikle PCR ve LCR kültür ile karşılaştırıldığında daha üstün duyarlılık ve özgüllük gösterebilir. Ancak bu konuda klinik deneyimler sınırlıdır. Bu testlerin kültür üzerinde potansiyel avantajları vardır. Bu avantajlar: Hızlı sonuç alımı, transport problemleri veya kültürün kullanımını engelleyen diğer durumlar var olduğunda uygulanabilirlik özelliği olarak sıralanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile materyalden ajanın direkt tanınmasına yönelik çalışmalar sürdürülmekte ve kültür yöntemlerine göre daha başarılı olduğu ifade edilmektedir. Bu konuda rutin çalışmalar sınırlıdır (9).

Daha önceki veriler PCR'ın ümit verici olduğunu ve ajanı belirlemede kültürden üstün olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada gonore tanısı için PCR

ile kültür ve mikroskopi yöntemlerinin karşılaştırılması ve PCR'ın ülkemizdeki uygulanabilirliği saptanarak mikroskopi ve kültür yöntemi ile etkenin belirlenemediği olgularda, tanı için alternatif yöntem olup olamayacağının araştırılması amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER:

Gonore, *N.gonorrhoeae*'nin sebep olduğu kolumnar ve transizyonel epitelin seksüel geçişli hastalığıdır. Hastalık seksüel temasın yanı sıra perinatal yolla da geçer. Primer olarak alt genital yolun mukozasını ve daha az olarak rektum, orofarenks ve konjonktivayı tutar. Ayrıca mukozal yüzeylerde komşuluk yoluyla yayılma kadında endometrit, salpenjit, peritonit ve bartholinit ile sonuçlanabilir, erkekte ise; periüretal apse ve epididimit gelişebilir. Akut salpenjit komplikasyonu kadın infertilitesinin yaygın sebeplerinden birini teşkil eder.

Gonore insanlığın bilinen en eski hastalıklarından birisidir. Organizma ve enfeksiyona verilen cevap hakkındaki temel bilgiler 80 yıl içerisinde yavaş yavaş oluşmuştur.1970 'lerde organizma hakkında yeni bilgiler edinilmiş ve 1990'ların başında gonokokun moleküler biyolojisi ve gonorenin patogenezi diğer bakteriler kadar iyi bilinmeye başlamıştır.

Çoğu toplumlarda gonoreyi kontrol etmek güç olmuş ve antimikrobiyal tedaviye rağmen hastalığın epidemiyolojisindeki sosyal, davranışsal faktörlerin varlığından dolayı yaygınlığı önlenememiştir. Ancak günümüzde endüstriyel ülkelerde enfeksiyonun insidansı hızla düşmektedir (12).

### Görünüm ve boyanma özellikleri:

Karakteristik olarak *N.gonorrhoeae* bakterilerin birbirlerine bakan yüzleri hafif iç bükey böbrek veya kahve çekirdeği görünümünde veya düz 0,6-1,0 µm büyüklüğünde diplokoklar şeklindedir. İrinden yapılan yayma preparatlarda bazıları hücre dışında bazıları ise lökositler içerisinde fagosite edilmiş olarak hücre sitoplazması içinde 3-5'li gruplar halinde bulunur. Çok taze ve çok eski olgularda genellikle hücre dışındadır. Gonokoklar sporsuz,

hareketsiz ve Gram olumsuzdur. Belirgin olmayan bir kapsül gösterebilir, fimbriyaları bulunabilir (5).

Diğer Neisseria türleri gibi gonokoklar da oksidaz yaparlar. Dimetil veya tetrametil parafenilen diamin hidrokloridin %1'lik taze eriyiği damlatılınca oksidaz olumlu bakteri kolonileri pembe renk alır. Bu özelliklerinden gonokok kolonilerini diğer bazı bakteri kolonilerinden ayırmada yararlanır.

Klasik olarak gonokoklar diğer Neisseria türlerinden selektif besiyerinde üreyebilme yeteneği, maltoz, sükroz ve laktoza etki etmeme ve glikozu fermente etme, nitratları redükte etme ve düşük ısıda üreyememe özellikleri ile ayrılırlar (5).

#### **Kültür özellikleri:**

Gonokok kuruluğa ve ısıya çok duyarlı bir bakteridir ve hasta örnekleri acilen uygun ortama ekilmelidir. Kullanılan besiyeri taze ve nemli olmalıdır. Optimal üreme ısıları 35-37 °C'dir. Gonokoklar aerob olmalarına karşın özellikle organizmadan yeni ayrıldıklarında %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama gerek duyarlar. Üremeleri için uygun pH 7,2-7,6 dır (5,12).

Gonokoklar basit besiyerlerinde üreyemezler özellikle organizmadan yeni ayrıldıklarında üreme açısından oldukça güçlük gösteren bakterilerdir. Gonokoklar çoğu yağ asitleri ile inhibe olduklarından ortamların içerisine yağ asitlerini absorbe eden nişasta ve diğer yağ asidi adsorbanları katılması gerekir. Tüm suşların kompleks büyüme ortamına gereksinimi vardır. Bunun için de besiyerine vitaminler, amino asitler, demir, glikoz ve diğer faktörlerin ilavesi gerekebilir.

Gonokokların en iyi üreyebildikleri besiyeri kaynamış kanlı jeloz ve çikolata agardır. Thayer-Martin besiyerinde diğer bakterilerden daha kolay ve çabuk ürerler. Yüksek konsantrasyonlarda saprofit mikroorganizma içeren

bölgelerden gonokokun izolasyonu daha güç olacağından antimikrobiyal ajanlar içeren ortamlar uygundur. Bu amaçla vankomisin, kolistin ve nistatin içeren çikolata agar kullanılmıştır (12).

Aynı zamanda proteus subtiplerini inhibe eden trimetoprim içeren Modifiye Thayer-Martin besiyeri yaygın olarak kullanılır. Ayrıca New York City besiyeri olarak adlandırılan yarı saydam selektif besiyeri de yaygın olarak kullanılmaktadır ve inhibitör olarak vankomisin, kolistin, trimetoprim ve nistatin veya amfoterisinB içermektedir (5,12).

Bazı suşlar vankomisine duyarlıdır, vankomisin içeren besiyerleri duyarlı suşları baskılar ve gonore tanısını bozabilir. Flora barındırmayan bölgeden alınan materyal antibiyotiksiz kültüre edilmelidir (12). Besiyerine acil ekim yapılmasının mümkün olmadığı durumlarda, Amies veya Stuart gibi uygun transport besiyerleri esas besiyerine ekilmeden önce gonokokları 6 saate kadar canlı tutabilmektedirler (12).

Gonokok; serumlu, habenli buyyonda ve jelozda 24-48 saatte ürer ve 4 tip koloni oluşturur. T1 (Birinci tip) koloniler ve T2 (İkinci tip) koloniler daha çok akut gonoreli hastalardan yeni izole edilen kolonilerdir. Büyük, düzensiz, basık, saydam veya hafif bulanık görünümde dirler, bekletilince yüzeylerinde papillalı bir görünüm ortaya çıkar. Bu koloniler P+ ve P++ olarak da adlandırılırlar yani pilili kolonilerdir. T1 ve T2 tipi koloniler daha virülandırlar. T3 (Üçüncü tip) koloniler ve T4 (Dördüncü tip) koloniler laboratuvar da beklemiş eski kültürlerde gelişen ve bazen kronik gonoreli hastalardan üretilmiş gonokok kolonileridir; küçük, yuvarlak, hafif konveks ve kabarık, düz yüzeyli opak kolonilerdir. T3 ve T4 kolonilere P- koloniler de denir, bunlar pilisiz kolonilerdir. Birinci tip kolonilerden diğer tiplere geçişin bir varyasyon sonucu olduğu kabul edilir (5,16).



**Yüzey yapıları:**

*N.gonorrhoeae*'nin hücre çeperi temel yapı olarak diğer Gram olumsuz bakterilerinkine benzer.

**Pili:** Birçok Gram olumsuz bakterinin de sahip olduğu gibi gonokoklarda da bulunur. Gonokokların yüzeylerinden dışarı doğru uzanan dikensi çıkıntılardır. Flagellalardan daha kısa ve incedirler. Pilili gonokoklar insan mukozal yüzeylerine daha iyi tutunabilme özelliğindedirler ve daha virülandırlar. Pililer ayrıca gonokokların nötrofiller tarafından fagosite edilmesini de önler (12,15,16).

Pililer, pilin proteini denilen molekül ağırlığı  $19\pm 2,5$  kd olan tekrarlayan protein alt birimlerden oluşur. Pilin proteinlerinin amino terminali hidrofobiktir ve suşlar arası antijenik benzerlik bölgesi burada yer alır. Karboksi terminali yanında ise antijenik değişiklik bölgesi bulunur ve bu bölge immun yanıtta çok önemlidir. Protein zincirinin orta kısımları ise konak hücreye tutunmayı sağlar. Bu özellikler pilus bazlı aşılarda elde edilmesinde çok önemlidir. Tek bir *N.gonorrhoeae* suşu antijenik kompozisyonları farklı pililer üretebilir (15). Pililerdeki varyasyonlar kromozomlarca düzenlenir ve pilili gonokoklar pilisini kaybedebilir. Pilisiz gonokoklar da mukozaya tutunabilir ancak mukozal hücrelerde daha az hasar yaparlar (12,15).

**Dış membran:**

Tüm Gram olumsuz bakterilerdeki gibi gonokoklarda en içte sitoplazmik membran ortada peptidoglikan hücre duvarı ve en dışta dış membranın yer aldığı bir hücre çeperine sahiptir. Dış membran lipooligosakkarit (LOS), fosfolipit ve değişik proteinler içerir (12).

### **Porin :(Por proteini)**

Başlangıçta protein I olarak adlandırıldı. Bu protein 32-36 kd' luk bir ağırlığa sahiptir ve membran lipooligosakkariti ile yakından ilişkilidir. Por proteini sıvı eriyiklerin hidrofobik dış membrandan hücre içine geçişini sağlar. Bu protein türler arasında stabil varyasyon gösterir ve en yaygın kullanılan gonokokkal serotipleme sisteminin temelini oluşturur. Protein I antijenlerine karşı monoklonal antikor kullanılarak serotipleme yapılır (32). Kesin por serovarları insan serumunun normal bakterisidal etkisine karşı koyarlar ve bakteriyemiye sebep olma olasılıkları yüksektir.

Por proteini gonokokkal bir aşının geliştirilmesine yönelik çalışmaların odak noktasıdır. Monoklonal antikorlarla aglütinasyon reaksiyonları sonucunda protein I'in serolojik tipleri tanımlanmıştır ve protein IA tipinde 18 serovar, protein IB tipinde ise 28 serovar ayrılabilmiştir (15,18). Protein IA genellikle dissemine hastalıklara, protein IB ise ürogenital hastalıklara neden olan türlerde bulunur. Yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları PIB suşlarında hiç PIA geninin olmadığını ve bunun tersinin de söz konusu olabileceğini göstermiştir. PIA suşları kompleman aracılı öldürmeye dirençli iken PIB suşları duyarlıdır. Protein I stabildir ve enfeksiyon esnasında antijenik değişiklik geçirmez (18).

### **Opasite proteini:( Opa)**

Önceleri protein II olarak adlandırılıyordu. Opa 20-28 kd ağırlığında bir dış membran proteindir. Yani protein ailesinin bir üyesidir ve sayıları 11'e kadar varabilen opa genleri ile üretilir (12,27). Por proteininin aksine Opa'nın ekspresyonu çok sık görülen varyasyonlara bağlı olarak değişir. Opa(-) gonokoklar olabileceği gibi Opa varyantlarının tümünü ekspresse eden

suşlar da olabilir, ancak üçten fazla varyant ekspresse edilmez (12). Opa ekspresyonu doğal enfeksiyon esnasında belirgin olarak değişir. Mukozal izolatların çoğu Opa ekspresse eder ve kolonileri opak görünür. Normalde steril olan bölgelerden elde edilen izolatlar Opa içermez ve kolonileri transparandır. Opa proteinleri kendi aralarındaki adezyonu artırdığı gibi fagositler de dahil olmak üzere tüm konak hücrelerine adherensi artırır. Kesin Opa varyantlarının epitelyal hücrelere invazyonunun arttığı görülür.

### **Protein III: (Rmp)**

Redüksiyon yapabilen protein olarak da bilinir, 30-31 kd moleküler ağırlığa sahiptir. Tüm gonokoklarda bu proteinin por proteini ve lipooligosakkarit ile yakın ilişkisi vardır ve suşlar arası bir antijenik varyasyonun olup olmadığını gösterir.

Rmp *N.gonorrhoeae*'ya karşı serumun bakterisidal aktivitesini azaltan blokan antikörlerin gelişmesini stümüle eder. Bu özellikle tekrarlayan enfeksiyonlarda önemlidir (12).

Bu sayılan proteinler dışında diğer dış membran proteinleri de tanımlanmıştır. Bunların bazıları *N.meningitidis* ile ortaktır. Örneğin H8 proteini protein II gibi ısıyla değişebilen bir yüzey proteindir.

### **Demir düzenleyici protein:**

Moleküler ağırlığı protein I'e benzeyen ve demir depoları azaldığında salınan bir proteindir (15). Demir düzenleyici proteinler *in vivo* transferrin ve laktoferrinden Fe sağlanmasında görev yapar. Nonpatojen suşlar genellikle transferrin ve laktoferrinden demiri ayıramaz. Farklı gonokokkal suşların virülansı bazı mukozal bölgelerde var olan laktoferrinden demiri serbestleştirebilme yeteneğindeki değişikliklerle ilgilidir (16,22).

### **IgAI proteaz**

Mukozal IgA'yı inaktive ederler. Bu protein N.gonorrhoeae ve N.meningitidis'de bulunur ancak patojen olmayan neisserialarda bulunmaz. Bu proteinin görevi mikroorganizmayı mukozal yüzeydeki salgısal IgA 'dan korumaktır.

Diğer dış membran proteinleri sadece anaerobik büyüme esnasında salınır ve bu proteinler anaerob ortamda büyüyen gonokokun yanı sıra mutlak anaerob bakteriler tarafından fallop tüplerinin sekonder invazyonuna neden olabilir (16).

### **Lipooligosakkarit(LOS)**

Diğer enterik Gram olumsuz bakterilerin aksine gonokokkal LOS uzun O-antijenik yan zincirler içermez. Ağırlığı 3-7kd dur. Gonokok kendiliğinden antijenik olarak farklı, çok sayıda LOS zincirini ekspres edebilir. Toksikite potansiyeli büyük oranda LOS'nin endotoksik etkisine bağlıdır (15).

Bakterinin peptidoglikan tabakası enflamatuvar cevaba katkıda bulunur. Gonokokkal peptidoglikan fragmanlar fallop tüplerinde toksiktir ve invitro kompleman tüketimine sebep olur. Ayrıca gonokokkal artrit-dermatit sendromlu hastaların sinoviyal sıvılarında peptidoglikan fragmanları bulunmuştur (12).

Gonokokların kapsül benzeri fonksiyona sahip bir yüzey polifosfatı oluşturduğu gösterilmiş ancak N.meningitidis'e benzer yapıda bir karbonhidrat kapsülü gösterilmemiştir (12).

### **Antijenik özellikleri:**

Pilin, protein II ve lipooligosakkarit gonokokun yüzey antijenleridir. Bu moleküller sıklıkla antijenik yapı değişikliğine uğrarlar ve konakçının immun sisteminden kaçabilirler. Pilin proteininin antijenik

değişim mekanizması üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmış ve bu mekanizmanın protein II için geçerli mekanizmadan farklı olduğu bulunmuştur.

Gonokokun pilin proteinini kodlayan çok sayıda gen vardır, ancak sadece bir gen ekspresyon bölgesinde yerleşir. Bu nedenle pilin geni alınan gonokoklar diğer bir genle yeni bir pilin proteini kodlayabilmektedir. Bu özellik gonokok tarafından antijenik olarak farklı pilin moleküllerinin ekspresyona edilebilmesine olanak tanır.

Protein II'deki antijenik değişim mekanizması ise DNA'ya pentamerik kodların eklenmesi veya çıkarılması şeklindedir. Lipopolisakkaritin antijenik değişim mekanizması ise bilinmemektedir.

#### **Suş Tipleri:**

Gonokokkal suşların karakterizasyonu için iki primer metot kullanılmaktadır; bunlardan biri auxotipleme diğeri ise serotipleme metotlarıdır. Auxotipleme kimyasal olarak tanımlanan ortamda büyüebilme yeteneği ve spesifik besinler veya kofaktörler yönünden suşların genetik olarak stabil gereksinimleri temelindedir. İdentifiye edilmiş 30'dan fazla auxotip vardır. Bunlar içerisinde "0"(sıfır) veya prolin gerektiren (Pro -) ve arginin, hipoksantin ve urasil gerektiren (AHU-) suşlar vardır.

En yaygın kullanılan serotipleme ise protein IA, IB ve antijenik olarak sınıflandırılmış por proteini temelindedir. Genellikle serotipleme ve auxotipleme ikisi aynı anda kullanılmaktadır.

#### **Genetik yapı:**

#### **Plazmidler:**

Gonokokkal klinik izolatlar çeşitli plazmidlere sahiptir. Çoğu gonokoklar Pcr plazmidi taşır ve bu plazmid TEM-1  $\beta$ -laktamaz geninin

aktarımını sağlar. İki Pcr plazmidi vardır bunlar 3,2 veya 4,4 mD moleküler ağırlığa sahiptir ve Haemophilus ducreyi ile bu plazmidin benzer olduğu hatta plazmidin bu bakteriden kazanıldığı iddia edilmektedir (12).

Gonokokkal plazmidlerin en küçüğü yaklaşık 4,2 kb boyutundadır ve bu doğal kazanılan ancak fonksiyonu bilinmeyen plazmid pJD1 olarak adlandırılır. Tüm klinik izolatların yaklaşık % 96'sı bu kriptik plazmid pJD1'i içerir. Kriptik plazmid DNA'sı hem plazmidli hem de plazmidsiz suşlarda gonokokkal kromozom içerisinde bulunur (13). Yapılan çalışmalar sonucu bu plazmidin tam nükleotid sekansı yayınlanmıştır (17).

Büyük olan plazmidi ise 36kb'lık konjugatif plazmididir. Bu konjugatif plazmid suşların %25'inde bulunur ve plazmid DNA'sının konjugatif transferinde bir seks faktörü olarak görev yapar (22).

Ayrıca gonokoklarda plazmid aracılı tetrasiklin direnci söz konusudur. Bu direnç ilk kez 1985 yılında tanımlanmıştır (22). Direnç konjugatif plazmid üzerinde lokalize olan tetM determinantı ile aktarılır. Bu tetM determinantı ribozomu tetrasiklin etkisinden koruyan bir proteini kodlayarak görev yapar (12).

### **Kromozomal mutasyonlar ve transformasyon:**

N.gonorrhoeae'daki bir seri bireysel mutasyon ve bunlar arası etkileşimler bakterinin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere ve tetrasiklinlere direncini doğurur, yine bu değişikliklerden bazıları bakterinin dış membran geçirgenliğini değiştirir. Bu gibi suşlar epidemiyolojik çalışmalar yönünden de önemlidir. Özellikle N.gonorrhoeae'nın tüm klinik izolatlarındaki pilili koloniler transformasyon için daha yeteneklidirler.

Pilisiz varyantlarda transformasyon yeteneği azalır. Ayrıca N.gonorrhoeae'da hiç bakteriyofaj bulunmamıştır (12).

### **Patoloji ve patogenezi:**

N.gonorrhoeae primer olarak kolumnar ve küboidal epitelide enfekte eder. Gonoreenin histopatolojisi de diğer piyojenik mukozal enfeksiyonlarınkine benzerlik gösterir. Bakteri mukozal epitele pili ve Opa aracılığıyla tutunur ve 24-48 saat içinde bakteri submukozal dokuya penetre olur (12,22). Submukozal dokuya penetre olduktan sonra epitel dökülmesi ile submukozal mikroapse gelişimi olur, mukopürülan bir eksudasyon gelişir bunları da güçlü nötrofil cevabı izler. Boyalı preparatlarda birkaç nötrofil içerisinde çok sayıda gonokok izlenir.

Ancak N.gonorrhoeae ile karşılaşan herkes hasta olmaz. Kesin olmamakla birlikte bunun nedenleri; inokulum miktarı, bakteri varyasyonları, non-spesifik immün yanıt, spesifik immünite olabilir. Ancak asıl faktörün bunlardan hangisi olduğu kesinlik kazanmamıştır. Ayrıca genital traktustaki normal flora gonokoku inhibe edebilir. Progesteron düzeyi yüksek olduğunda gonokok inhibe olabilir, bu gebelik döneminde hastalığın önlenmesinde bir faktör olarak karşımıza çıkabilir (22).

Farklı gonokokkal suşların virülansı bazı mukozal bölgelerde varolan laktoferrinden demiri serbestleştirebilme yeteneği ile ilgilidir. Ayrıca IgA1 proteaz sIgA'yı inaktive eden önemli bir virülans faktörü olabilir (22). Gonokokkal LOS fallop tüplerinde mukozal hasar yapar ve patogenezi önemli olabilen; proteaz, fosfolipaz, elastaz gibi enzimlerin salgınımına neden olur. Bazı gonokoklar konakçının öldürme mekanizmalarına direnç göstererek hücre içinde çoğalmayı sürdürebilir.



Bakteriyel enfeksiyondan birkaç hafta sonra dahi dokuda anormal lenfositik ve mononükleer infiltrasyon kalabilir. Tedavi edilmeyen enfeksiyonlarda zamanla lenfosit ve makrofajlar nötrofillerin yerine geçerler (12).

Pilili bakteriler genelde kümeler halinde bulunurlar ve hücre dışında kalma eğilimindedirler, buna karşın pilisiz olanlar fagositlerce daha kolay sindirilir ve öldürülür (22).

Servikal mukusta bulunan tripsin benzeri proteazlar opak kolonilere (O+) yani proteaz duyarlı kolonilere karşı etkilidir, (O-) transparan koloniler ise proteaza rezistandır. Transparan koloniler daha çok endoservikal ve tubal kültürlerden elde edilebilirler. Menstrüel dönemde proteaz duyarlı (O+) koloniler artar ve dolayısıyla bu dönemde enfeksiyonun tubalara yayılımında bir artma gözlenir. Opak koloniler semptomatik üretritli erkeklerden ve menstrüel siklusun ortasındaki kadın hastalardan alınan servikal kültürlerden elde edilirler.

Oysa transparan koloniler (O-) asemptomatik üretritli erkeklerden, menstrüel dönemdeki kadınlardan ve gonoreenin invazif formlarından elde edilirler. Gelişen bakterisidal antikorlar direkt LOS antijenlerine karşı olan IgM tipi antikorlardır. Serogrup WI gonokoklar arasında serum IgM antikoruna doğal rezistans saptanır. Yüzey proteinleri ve LOS antijenleri çeşitli mutasyonlarla değişince gonokoklar dirençli hale gelirler (22).

#### **Klinik :**

Gonokokkal enfeksiyonun semptomları ve bulguları inokülasyon bölgesine, hastaların cinsine, yaşına ve enfeksiyonun süresine ayrıca gonokokun lokal veya sistemik yayılışına bağlı olarak değişir. Gonokok genitoüriner traktusun, göz, rektum ve boğazın müköz



membranlarını tutar buralarda doku invazyonuna yol açar ve akut süpürasyon oluşturur (15).

## **I-Genital enfeksiyonlar**

### **1-Erkeklerde gonokokkal enfeksiyon:**

Genelde enfeksiyon sadece üretrayı tutar ancak %5 oranında faringeal gonore görülebilir. Homoseksüel erkeklerde ise enfeksiyon üretra, anal kanal, farenksi tutabilir. Erkeklerde gonokokkal üretritinkubasyon periyodu 2-7 gündür. Genelde pürülan üretral akıntı tipiktir ayrıca disüri ve sık idrara çıkma yanı sıra meatal eritem izlenebilir (5,15,22).

Hastalığın bir komplikasyonu olarak tedavi edilmeyen vakalarda epididimit gelişebilir; epididimit üretral gonorenin en yaygın komplikasyonudur. Genç erkeklerde görülen epididimitlerin %10'undan gonokoklar sorumludur. Ayrıca fibrozis gelişerek bazen üretral darlıklara yol açabilir ancak yaygın değildir (15,16). Gonorenin nadir görülen komplikasyonları olarak penil lenfanjit, periüretral apse, akut prostatit, seminal vaskülit sayılabilir.

### **2-Kadınlarda gonokokkal enfeksiyon:**

Jinekolojik olgularda gonore %0,1-0,5 arasında görülmektedir (36). Kadınlarda enfeksiyonun en çok görüldüğü bölge servikstir, bunu daha az olarak üretra, anal kanal ve farenks izler. Servikal gonoreli kadınların yaklaşık %20'sinde salpenjit meydana gelir (22). Hastaların %70-80'inde endoservikal enfeksiyonla eş zamanlı olarak üretrit görülür ve disüri şikayeti vardır (16). Hasta normalden koyu, sarı renkli bir vaginal akıntı tanımlar ayrıca intermenstrüel kanamalar görülebilirse de

hastalık bazen asemptomatik kalabilir. İnkubasyon periyodu on gündür ancak belirtilen süre değişken olabilir.

Genelde N.gonorrhoeae'nın AHU- ve ilgili auxotipleri ile gelişen enfeksiyonlar asemptomatik kalmaya eğilimlidirler (12). Eğer hasta abdominal ve pelvik ağrıdan yakınıyorsa bu semptom sıklıkla salpenjitle birlikte düşünölmelidir. Enfeksiyon tedavi edilmezse servisit ve endometrit salpenjite, salpenjit peritonite, tubal oklüzyon veya süperenfeksiyona ilerleyebilir. Hastalığın asemptomatik kaldığı bireyler taşıyıcılık açısından önemlidir. Taşıyıcılığın ortalama süresi kesin değilse de bu süre bir yılı aşabilir (22).

## **II-Genital organ dışı yerleşimler:**

### **1-Lokal manifestasyonlar:**

**Konjonktivit:** Konjonktivanın otoinokölasyon sonucu enfekte olması sonucu sıklıkla görülür. Ciddi bir enfeksiyondur. Pürölan eksuda vardır ve güçlü antibiyotik tedavisi uygulanmazsa korneal ülserasyon gelişebilir. Konjonktivit genital enfeksiyonlardan sonra gonokokların en çok neden oldukları hastalıktır (5).

Yeni doğanlarda vaginal kanaldan bulaşarak konjonktivaya yerleşen gonokoklar iltihaplı ve tedavisiz kalırsa körlüğe kadar gidebilen konjonjektivitelere neden olurlar.

**2-Anorektal gonore:**Komplike olmayan gonoreli kadınların %40 kadarında yine enfekte homoseksüel erkeklerde benzer bir oranda rektal kültürler pozitif bulunur. Primer enfeksiyon bölgesi olarak rektum homoseksüel erkeklerde %40 kadar görülürken bu oran kadınlarda %5'e düşmektedir (12). Çoğu hastalar asemptomatiktir ancak akut proktit semptomları da görölebilir.

**3-Faringeal gonore:** Faringeal gonore enfeksiyonunda ana risk faktörü orogenital seksüel temastır. Kadın hastalarda oran %10-20, homoseksüel erkeklerde %10-25 kadardır. Faringeal enfeksiyonların çoğu asemptomatiktir veya kendiliğinden iyileşir, ayrıca farenksten diğer hastalara bulaş nadirdir. Tek enfeksiyon bölgesi olarak farenks nadir görülür .

**4-Pelvik inflamatuvar hastalık(PID):** Kadınlarda önemli ve gürültülü seyreden bir hastalık tablosudur ve olguların %50 sinde etken *N.gonorrhoeae*'dir (5). Assendan genital gonore enfeksiyonu olan kadınların %10-20 sinde geliştiği tahmin edilir ve endometrit, salpenjit, tubaovarian apse, pelvik peritonit ve diğer lokal komplikasyonların bir kombinasyonu olarak görülür (12,16). Oluş mekanizması kesin bilinmemekle birlikte bakterinin fallop tüplerinde geçirgenliği artırarak hem kendisinin hem de aerob ve anaerob bakterilerin pelvise geçişini sağladığı düşünülmektedir (5). Rahim içi araç kullanımı PID riskini artırır buna karşılık oral kontraseptif kullanımı riski azaltır. Ayrıca önceden geçirilmiş PID yeni ataklar için riski artırır. En belirgin semptom bilateral alt abdominal ağrıdır. PID'in başlangıcı sıklıkla menstrüel siklusun başlangıcını izleyen birkaç gün içinde olur.

PID'in en ciddi sekeli fallop tüpü obstrüksiyonuna bağlı infertilitedir ve tek ataktan sonra kadınların %15-20 sinde, üç veya daha çok atak geçirenlerin %70-80' inde görülebilir. Ancak yine de gonokokkal PID' i takiben görülen infertilite oranı *C.trachomatis*'in etken olduğu PID'den daha düşüktür. Bunun sebebi belki de gonorede daha fazla akut inflamatuvar bulgu gelişmesi ve dolayısıyla hastaya daha kısa sürede tanı konarak tedavi verilebilmesindedir. Ayrıca enfeksiyon ektopik gebelik riskini de artırır (22).

**5-Perihepatit:**Akut perihepatit (Fitz-Hugh ve Curti sendromu) primer olarak fallop tüplerinden karaciğer kapsülüne ve onu örten peritona *N.gonorrhoeae* veya *C.trachomatis*'in direkt yayılması ile meydana gelir. Erkeklerde nadir görülen perihepatit ise lenfatik yayılım veya bakteriyemik disseminasyondan kaynaklanır. Belirtileri abdominal ağrı ve hepatik hassasiyettir. Gençlerde sağ üst kadran ağrısının ayırıcı tanısında perihepatit düşünülmelidir. Laparoskopide karaciğer kapsülü ile parietal periton arasında “keman yayı” şeklinde adezyonlar saptanır (12).

**6-Gebelikte gonore:**Gebelikte gonore geçiren hastada spontan abortus riski artmıştır. Gonoreli gebe prematür doğum, erken membran rüptürü ve perinatal infant mortalitesi riski taşır (12). Ayrıca korioamniyonit gelişebilir (5).Yaygın gonokokkal enfeksiyon yönünden gebelikte görülen enfeksiyonun bir risk faktörü olup olmadığı konusunda çelişkili raporlar vardır.

**7-Yaygın gonokok enfeksiyonu:**Ateş, gezici eklem ağrıları, bir veya daha çok eklemde artrit, tenosinovit ve deri döküntüleri ile seyreden ağır bir tablodur. Yaygın enfeksiyon enfekte hastaların %0,5-3'ünde gelişir (16).Genç erişkinlerde enfektif artrit yaygın bir sebebi olarak da gonore karşımıza çıkar.

Yaygın gonokok enfeksiyonunun nadir görülen komplikasyonları olarak menenjit, osteomyelit, Waterhouse-Friederichsen sendromu ile birlikte kontrolsüz sepsis ve adult respiratuar distres sendromu sayılabilir.

Yaygın enfeksiyona neden olan gonokoklar genelde AHU-auxotipi ve PorIA serovarıdır. Ajan, insan serumunun bakterisidal etkisine dirençli ancak penisiline duyarlıdır. Yaygın gonokok enfeksiyonlu hastaların %13 kadarında kompleman eksikliği vardır.

Ayrıca enfeksiyonun bu formu kadın hastalarda daha sık görülür ve yaygın enfeksiyonlu kadınların %50'sinde enfeksiyon süreci menstrüasyonun başlangıcından sonraki yedi günü kapsar (12,16).

Yaygın enfeksiyonun en sık görünümlerinden biri artrit-dermatit sendromudur. Birkaç eklemden asimetrik tutulum izlenir, hastaların %75'inde tipik dermatit vardır, genelde papül ve pistüller tarzındadır. En çok tutulan eklemler el, ayak, sternoklaviküler eklem ve temporomandibüler eklemdir. Yaygın enfeksiyon safhasında kan kültürü, septik gonokokkal artrit safhasında ise sinoviyal sıvı kültürleri pozitif bulunur. Yaygın enfeksiyonun seyri sırasında nadir de olsa aortik kapağı tutan enfektif endokardit görülebilir (12).

**8-Neonatal ve pediatrik enfeksiyonlar:** Yeni doğanlarda en sık görülen gonokok enfeksiyonu gonokokkal konjonktivittir. Çok nadir görülen bir diğer form ise yeni doğanlarda sistemik hastalık gelişimidir. Bu tabloda septisemi ve artrit birlikte bulunur. Neonatal dönemde vaginal enfeksiyon yaygın değildir nadiren rektal enfeksiyon olabilir. Bunların dışında klinik görünüm erişkinlerden farklı değildir. Bir yaşına kadar olan periyotta çocuklar enfeksiyonu hijyeni kötü olan ebeveynlerden non-seksüel yolla alır (12).

#### **Tanı:**

Gonoreenin laboratuvar tanısı enfekte bölgeden *N.gonorrhoeae*'nin identifikasyonu temeline dayanır. Kültür ile bakterinin izolasyonu tanısal standarttır. Ancak kültüre olanağı yoksa veya örnek transportunda güçlük varsa kültür harici testler tanı için kullanılabilir. PCR veya LCR ile DNA amplifikasyonu kültürle kıyaslanabilir hatta daha üstün duyarlılık ve özgüllük gösterebilir ancak klinik deneyim sınırlıdır (12). Selektif ortamda kültür semptomatik üretritli erkeklerde

%95, endoservikal enfeksiyonlu kadınlarda %80-90 duyarlılığa sahiptir (12).

Erkeklerde uygun bir silgeç 2-3 cm. üretra içerisine itilerek üretral örnekler alınır. Üretral eksuda yetersizse 20-30 ml. ilk akım idrarı alınır ve santrifüje edilerek kullanılabilir. Endoservikal örnekler ise ilk eksuda silinerek silgeç vajen duvarına değdirilmeden eksternal oşa yerleştirilip döndürülerek alınır (12). Başarılı bir izolasyon iyi örnek toplanmasına, alınan örneğin laboratuvara hızlı ulaştırılmasına ve uygun kültür ortamının kullanımına bağlıdır.

Floralı bölgelerden yapılan ekimlerde gerekli büyüme ortamının yanı sıra diğer bakterilerin üremesini baskılayan; vankomisin, sodyum kolistimetrat ve nistatin içeren seçici Thayer-Martin besiyerinin kullanılması uygun olur. Florası olmayan bölgelerden yapılan ekimlerde kaynamış kanlı jeloz, çikolata agar gibi seçici olmayan besiyerleri kullanılabilir (15). Karakteristik gonokokkal koloniler agarda 35-37<sup>0</sup>C de 24-48 saatlik inkubasyondan sonra görülür. İzolasyonda bakteri %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosfer ortamında tutulur. Kolonilerden oksidaz olumlu bulunanlar gonokok varlığını doğrular. Bununla birlikte genital bölgeden elde edilen izolatların %5'inin N.meningitidis olma ihtimali vardır. Bu türleri ayırt etmek için şeker utilizasyon reaksiyonları uygulanır. Bu deneylerde glikozu fermente edip diğer şekerlere etki etmeyen türler N.gonorrhoeae olarak kabul edilir. Fermantasyon deneyleri için Sistin-triptik digest agar (CTA) kullanılır (5,12,15).

Gonokok enfeksiyonun tanısında boyalı preparatlar özellikle semptomatik üretritli erkeklerin tanısında yaklaşık %98 duyarlılığa sahiptir. Basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bununla beraber asemptomatik erkeklerde üretradan, rektumdan alınan örnekler ile

kadınlarda serviksten alınan örneklerde duyarlılık yaklaşık %40-50 kadardır (34). Yapılan incelemelerde bol parçalı lökositler, bunların dışında ve sitoplazmaları içerisinde 3-5'li gruplar halinde Gram olumsuz kahve çekirdeği şeklinde diplokokların görülmesi uygun klinik bulgular ile birlikte yeterli tanıyı sağlayabilir (5). Yine de Gram boyalı preparat rektum, farenks veya diğer bölgelerin enfeksiyonunda tanı koymak için tek başına bir tanı metodu olarak kullanılmamalıdır. Zira diğer neisseriaların bu bölgelerde bulunabileceği unutulmamalıdır. Hastalık materyalinde ELISA yöntemi kullanılarak *N.gonorrhoeae* antijenlerinin ortaya konulması sonucu hastalık tanısı özellikle kemoterapi uygulanmış bireylerde başarılı sonuçlar vermektedir (12).

Poliklonal ve monoklonal antikorları kullanan bir ELISA sistemi(Gonozyme) yaygın kullanıma sahiptir. Semptomatik erkeklerde bu test Gram boyama ile aynı duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Kadınlarda ise testin duyarlılığı düşüktür (16). Örnekte *Neisseria gonorrhoeae*'nın kendisini veya antijenini gösteren testlerden, İmmun floresan mikroskop, DNA problemleri ile antijen belirleme ve DNA amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (12).

Önceki veriler PCR'ın ümit verici olduğunu ve genital enfeksiyonları belirlemede kültürden üstün olduğunu göstermektedir. Son yıllarda PCR ile gonokokun varlığını gösterebilmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır ve ümit verici sonuçlar alınmıştır. PCR günümüzde çok çeşitli enfeksiyon etkenlerinin saptanmasında başarıyla uygulanmaktadır. Bunun yanı sıra spesifik antibiyotik direncinin saptanmasında PCR teknolojisi kullanılabilir, direncin genetik aktarımından sorumlu gen bölgesinin varlığı gösterilerek sonuç alınabilmektedir. *N.gonorrhoeae*'da penisilinaz üretiminden sorumlu ve



plazmid üzerinde bulunan TEM 1  $\beta$  laktamaz geninin araştırılmasında PCR kullanılmıştır (8). Diğer kültür dışı testler özellikle endoservikal enfeksiyonlarda kültürden daha az duyarlılığa sahip olmakla birlikte bazı testler Gram boyamadan daha üstündür. Ancak kültür dışı testlerin hiçbiri rektal ve faringeal enfeksiyonlar yönünden yeterince çalışılmamıştır. Bu sebeple kültür *N.gonorrhoeae* eldesinde standart test olarak kalmaktadır.

### **Epidemiyoloji:**

Gonore dünyanın her yerinde yaygın görülen bir enfeksiyondur. Son yıllarda yapılan istatistiksel çalışmalar Amerika ve Avrupa'da insidansın düştüğünü göstermektedir. Hastalığın en yüksek insidansı gelişmekte olan ülkelerde gözlenmektedir (12,16). Hastalık açısından en yüksek risk taşıyan grup 20-24 yaşlarındaki kadın ve erkeklerdir. Erkeklerde kadınlara nazaran daha çok olgu rapor edilmiştir. 1960' lardan 1975'e gelinceye kadar gonore hızla artmış, sonra sayı belirli bir oranda kalarak 1990'larda azalmıştır (37). Ülkemizde hastalığın sıklığı konusunda fazla yayın yoktur 1978'de %1,1 olan sıklık, 1982'de %3,55'e çıkmıştır (18).

Hastalık özellikle siyah ırkta beyazlardan daha sık görülür bunun yanı sıra sosyoekonomik düzeyi ve eğitim düzeyi düşük, şehirde ikamet eden ve bekar bireylerde daha sık görülür. Ayrıca homoseksüel erkekler arasında hastalığın yaygınlığı fazladır.

**Geçiş:** Gonore cinsel ilişki yoluyla bulaşan bir hastalıktır. Enfekte kadın hastadan partnerine geçiş oranı tek bir temasta %20'dir. Erkek hastadan partnerine geçiş oranı ise tek bir temasta %50'dir. Temas sayısı arttıkça bu geçiş oranları da artmaktadır. Bu nedenle partner sayısı birden fazla ise oranlar da normal popülasyondan daha yüksektir (5,12).



Ayrıca bu yüksek oranlara genç yaş, düşük sosyoekonomik düzey, fuhuş, ilaç bağımlılığı, geçirilmiş gonore veya diğer seksüel geçişli hastalık hikayesi gibi faktörlerde katkıda bulunur (16). Hastalığın geçişinde asemptomatik enfeksiyonlu bireyler büyük rol oynarlar (5,12).

**Korunma ve Kontrol:** Uygun kullanılırsa kondom gonore ve mukozal yüzeyden geçebilen diğer enfeksiyonlardan yüksek derecede korunma sağlar. Ayrıca rutin muayenesi yapılan risk grubu kadınlardan gonore için örnek toplanmalıdır. Bunun dışında koruyucu önlemlerin, kondom gibi bariyer kontraseptiflerin kullanımı arttırılmalı, personel ve toplum bilgilendirilmelidir (5,12).

Gonoreyi önlemek için bir aşı geliştirilmesi araştırmada öncelikli bir konudur. Bu konuda Pilin ve Por proteinleri üzerine çalışmalar vardır. Ancak Pilin ve Opa'daki antijenik değişkenlik özelliği bir aşı geliştirilmesine engel teşkil etmektedir. Bu nedenle antijenik stabilitesi daha fazla olan Por proteini aşı eldesinde aday protein olarak araştırılmaktadır (12,15).

#### **Tedavi:**

Gonoreli olguların etkin tedavisi hastanın enfeksiyonundan çok toplum sağlığı yönünden oldukça önemlidir. Gonore tedavisiz de iyileşebilen bir enfeksiyondur. Bununla beraber tedavisiz kalan bireylerde epididimit, prostatit, salpenjit, gibi komplikasyonlar görülebilir. Yetişkinlerde komplike olmayan hastalarda önerilen tedavi rejimi tek doz olarak Ceftriakson 125mg.i.m., Cefixim 400mg. oral, Siprofloksasin 500mg. oral veya Ofloksasin 400mg. oral ve 1.0gr.oral Azitromisin ya da günde iki kez 100mg oral Doksisisiklin ile 7 gün süreyle tedavi şeklindedir. N.gonorrhoeae antibiyotiklerin büyük bir çoğunluğuna duyarlı bir bakteridir. Diğer çeşitli sefalosporinler, kinolonlar ve diğer antibiyotikler

tedavi amacıyla kullanılabilirse de önerilen bu dört rejime üstünlükleri görülmemiştir. Komplike olmayan gonoreli gebeler tek bir dozda 250mg. i.m. Sefriakson ile tedavi edilmelidir. Tedaviden 1-2 ay sonra hastanın gonore ve diğer enfeksiyonlar yönünden tekrar taranması önerilir (12).



## **GEREÇ VE YÖNTEM:**

### **GEREÇ :**

#### **Kullanılan araç ve gereçler:**

Steril silgeçler(STD-PEN Abbott Laboratories,STD-EZE Abbott Laboratories)

#### **Cihazlar:**

- 1- -20<sup>0</sup>C'lik derin dondurucu
- 2- Vorteks cihazı NM 110 (Nüve Ankara,Türkiye)
- 3- Etüv (En 400 Nüve Ankara,Türkiye)
- 4- Mikrosantrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen EBA 12 Tuttingen, W.Germany)
- 5- Su banyosu (Kottermann Labortechnik, W.Germany)
- 6- PCR cihazı; Minicycler (MJ Research Watertown, Massachusetts U.S.A)
- 7- Elektroforez cihazı (TITAN Plus Electroforesis, Helena Labrotories Beamuont,Texas,U.S.A)
- 8- UV kaynağı (TFX 20C, Wilber Lourmat, France)
- 9- Fotoğraf makinesi (Poloroid Gel Cam.U.K.)

#### **Kullanılan kimyasal maddeler:**

- 1- Oksidaz ayıracı; dimetil- parafenylenediamine hydrochlorid'in saf sudaki %1'lik eriyiği
- 2- Sodium fosfat tampon sistemi pH:7,2
- 3- Gram boyası seti
- 4- Agaroz (Promega ,Corp Madison ,U.S.A)
- 5- 1X'lik PCR buffer (Promega Corp.Madison.) İçeriği:50mM KCl, 10 mM TRİS pH:8, 100µg/ml , 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

6- K tamponu;İçeriği:1X'lik PCR buffer, %15 Tween 20(Sigma Chemical St.Louis U.S.A), 20pg/ml Proteinaz K(Promega Madison U.S.A)

7-0,5X'lik TBE tamponu;0,045M Tris-borate 0,001M EDTA

8- Primerler(DNA International Inc U.S.A)

HO1 (5'GCTACGCATACCCGCCGTTGC3')

HO3 (5'CGAAGACCTTCGAGCAGACA3')

9-dNTP solüsyonu (Promega, Corp. Madison U.S.A). İçeriği: Her birinden 1,25 mM olmak üzere;dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

10-25 mM MgCl<sub>2</sub>(Sigma Chemical St.Louis U.S.A)

11-Taq polimeraz (Promega, Corp Madison WI 5Ü/ml)

12-DNA pürifikasyon kiti (Promega, Wizard PCR Preps, DNA purification systems, Madison, WI,U.S.A)

13-MspI Restriksiyon enzimi (Promega Madison WI.,U.S.A)

14-123bp'lik DNA ladder ve PBR 322 Hae III ile kesilmiş DNA markeri (Sigma Chemical St.Louis U.S.A)

#### **Besiyerleri:**

Kanlı agar ve çikolata agar besiyerleri (Biolife ,Italy)

#### **Diğer malzemeler:**

1- Desikatör,beyaz mum

2-Eppendorf tüpleri

3-Filmler(Poloraid /siyah-beyaz 667 3<sup>1/4</sup> x 4<sup>1/4</sup> Pack Film U.K.)

## YÖNTEM:

Çalışmamızda Ekim 1996-Haziran 1997 tarihleri arasındaki dönemde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı Polikliniğine başvuran, üretral akıntı, dizüri şikayetleri olan 16 erkek hastadan alınan üretral akıntı örneği ile birlikte, yine aynı dönemde hastanemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniğine pürülan vaginal akıntı şikayetiyle başvuran 40 kadın hastadan alınan servikal akıntı örneği ve rutin muayeneleri esnasında 21 hayat kadınından alınan servikal akıntı örneği incelenerek değerlendirme yapıldı.

Üretral akıntı örneklerini almak için erkeklerde (STD-PEN Abbott Laboratories) ve servikal akıntı örneklerini almak için kadınlarda (STD-EZE Abbott Laboratories) markalı özel steril silgeçler kullanıldı. Erkek hastalarda örnek alırken silgeç ile üretra içerisine 2-4 cm. kadar girildi ve silgeç hafif çevrilerek örnek alındı. Kadın hastalarda ise örnekler jinekolojik pozisyonda silgeç vajen duvarına temas ettirilmeden eksternal os içinden girilerek serviksten alındı. Her iki cinste de hastalardan üçer örnek alındı. Örneklerden birisi kültür ve Gram boyama için kullanılırken diğerine fosfat tamponu eklenerek PCR uygulanıncaya kadar -20 °C de saklandı. Üçüncü örnek ise diğer üretrit ve genital enfeksiyon ajanlarını izole etmek için kullanıldı. Direkt preparat yapılarak *T. vaginalis* araştırıldı. Clearview (UNIPATH) enzim immün assay yöntemiyle *C.trachomatis* araştırıldı. Ayrıca adi kültür yapılarak diğer patojenler klasik bakteriyolojik yöntemlerle incelendi. Bunların yanısıra Ureaplasma ve Mycoplasma için özel besiyerleri hazırlandı. U-broth besiyerine ekimi yapılan örnekler 37 °C de, mumlu kavanozda 18-24 saat

inkübe edildi ve besiyerinin sarıdan kırmızıya dönüşmesi *U.ürealiticum* ürediğinin göstergesi olarak kabul edildi. *M.hominis*'i araştırmak için M-agara ekim yapıldı. 5 gün mumlu kavanozda inkübasyonu takiben mikroskop altında koloni varlığı araştırıldı. Üreme olmayan plaklar 15 gün süreyle her gün incelendi. Şüpheli plaklar modifiye Dienes plak boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi.

#### **Gram Boyama Yöntemi:**

Boyalı preparat hazırlanacak lamalar temizlendi. Lamaların preparat yapılacak yüzleri alevde yalıtılarak silgeç ile alınan örnek lama yayıldı. Hazırlanan preparat havada kurutuldu alevde tespit edilerek şu yöntemle boyandı:

Preparatın üzerine gentian moru eklenerek iki dakika bekletildi.

Boya döküldükten sonra preparatın üzerine lügol eklendi. Bir dakika bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkandı.

Preparatın üzerine %96 'lık etil alkol eklendi, alkolün preparatın her yerine temas etmesine dikkat edilerek dekolore edildi. Aynı işlem 2-3 kez tekrarlandı. Preparat çeşme suyuyla yıkandı.

Sulu fuksin ile 30 sn. boyandı, çeşme suyuyla yıkandı. Kuruduktan sonra immersiyon objektifi ile incelendi ve nötrofillerin içinde veya dışında Gram olumsuz diplokoklar araştırıldı.

#### **Kullanılan Besiyerleri:**

**Kanlı agar besiyeri:** Adi jeloza %7 koyun kanı eklenerek hazırlandı. Adi jeloz otoklavda 121<sup>0</sup>C 'de 15dk.steril edildikten sonra 45<sup>0</sup>C'ye kadar soğutuldu ve kan eklendi. Sonra 8cm. çaplı petri kutularına dökülerek, kullanılıncaya kadar +4<sup>0</sup>C de buzdolabında saklandı.

**Çikolata agar besiyeri:** Adi jeloz steril edildikten sonra 70<sup>0</sup>C'ye kadar soğutuldu, üzerine %7 koyun kanı eklendi ve karıştırıldı, 8 cm. çaplı petri kutularına dökülerek +4<sup>0</sup>C'de buzdolabında saklandı.

**Oksidaz Testi:** N.gonorrhoeae'nın identifikasyonu için kullanıldı. Oksidaz ayıracı; dimetil- para phenylenediamine hydrochlorid'in saf sudaki %1'lik eriyiği, her gün taze olarak hazırlandı. Bir parça kurutma kağıdı üzerine bir damla oksidaz ayıracı damlatıldı üzerine şüpheli koloniden eküvyonla alınan örnek eklendi. 10 dk içinde koyu pembe renge dönüşen örnekler oksidaz olumlu kabul edildi.

#### **Kültür Yöntemi:**

Üretral akıntı örneklerinden biri ile Gram boyalı preparat hazırladıktan sonra N.gonorrhoeae izolasyonu için kanlı agar ve çikolata agar besiyerlerine ekim yapıldı. Ekimler mumlu kavanoz (desikatör) içerisinde %5-10 CO<sub>2</sub> ortamında 37<sup>0</sup>C'de 24-48 saat inkübe edildi. Üreme saptadıktan sonra oksidaz ayıracı; dimetil para fenilediamin hidrokloridin %1'lik saf sudaki eriyiği bir parça kurutma kağıdına damlatıldı şüpheli koloniden alınan örnek üzerine eklenerek pembe, kırmızıya dönüşen örnekler oksidaz olumlu kabul edildi. Oksidaz olumlu bulunan kolonilerden Gram boyama yapıldı. Oksidaz olumlu, Gram olumsuz diplokoklar N.gonorrhoeae olarak kabul edildi.

#### **PCR Yöntemi:**

PCR yöntemi uygulanırken Ho ve arkadaşlarının 1992 yılında yayınladıkları çalışmaları referans alınmıştır (14).

Özel silgeçlerle alınan ve üzerlerine 2 ml. fosfat tamponu eklenen üretral ve servikal örnekler; materyalin silgeçten salınması için 1 dakika süreyle vortekste çalkalandı.

1-Silgeç çıkarıldı, materyal eppendorf tüpüne aktarılarak 5000 devirde, 10 dk. santrifüjlendi.

2-Pellet görüldükten sonra üzerindeki sıvı faz atıldı.

3-Pelletin üzerine 100 µl K tamponu konuldu.

4-Hücre süspansiyonu 60°C'de 1saat inkübe edildi. Daha sonra proteinaz K'yı inaktive etmek için 95°C'de 10 dakika bekletildi.

5-Örnek -20°C'de bir gece bekletildi.

6-Deneyimizde primer olarak cppB geni ile hem kromozomda hem de 4,2 kb'lik N.gonorrhoeae kriptik plazmidinde taşınan HO1 ve HO3 olarak anılan 20'ser bazlık primerleri kullanıldı.

HO1 (5'GCTACGCATACCCGCGTTGC3')

HO3 (5'CGAAGACCTTCGAGCAGACA3')

7- PCR amplifikasyonu: PCR 0,5ml'lik tüplerde gerçekleştirildi. Toplam reaksiyon volümü 50µl olarak tutuldu. Bu reaksiyon volümü aşağıda belirtilen ayraçları içermektedir.

-Bakteri DNA süspansiyonu	10µl
-dNTP solüsyonu (Her birinden 1,25 mM olmak üzere;dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	4µl
-10X PCR tamponu (500 mM KCL,100mM Tris HCl pH:9, %1 Tritox 100 )	5µl
-25 mM MgCl <sub>2</sub>	5µl
-Primer stoğundan(10 pm/µl)	2µl
-Taq DNA polimeraz (5 Ü/µl)	0,2µl
- Distile su	23,8µl
Toplam	50µl



8-50µl mineral oil ile kaplanan tüpler Minicycler PCR cihazına konuldu ve amplifikasyon aşağıda belirtilen ısı ve sürelerde şu üç basamağı izleyerek gerçekleştirildi:

Basamak 1: 94<sup>0</sup>C’de 30 saniye “denatürasyon”

Basamak 2 : 55<sup>0</sup>C’de 1 dakika “annealing”

Basamak 3 : 74<sup>0</sup>C’de 30 saniye “extension”

9-Amplifiye edilen PCR ürünleri 1µg/µl ethidium bromid içeren %1,5’luk agaroz jel içinde elektroforeze tabi tutuldu. Jel yapımında 0,5X’lik TBE tamponu (0.045M Tris, 0.045 M Borik asit , 0.001 EDTA) kullanıldı.

#### **Jelin hazırlanışı;**

50 ml tampon, 0,75 gr. agaroz ile erlende karıştırıldı ve bu karışım kısık ateşte kaynatıldı. Jel tamamen eridikten sonra ateşten alındı ve 45°C’ye soğutuldu. Beş mikrolitre ethidyum bromid (10mg/ml) eklenip karıştırıldı. Hazırlanan jel tarak yerleştirilmiş kalıba dökülerek düzgün bir şekilde katılaştırıldı. Pipetle örneğin dip kısmından 15µl alındı ve 3µL yükleme tamponu ile iyice karıştırılarak jelin tarak boşluklarına dikkatlice bırakıldı. Son tarak boşluğuna da PCR’da daha önce amplifiye edilen 259 bp’lik HBV gen parçacığı konuldu. Bu işlemlerden sonra 1X’lik TBE tamponu içeren tankta 5V/cm’ de elektroforez yapıldı. Jeldeki birinci boşluk marker için bırakıldı. Marker olarak 123 bp’lik DNA ladder kullanıldı. Marker DNA parçacıklarının uzunluğu bilindiğinden parçacıkların jelde göçü ölçüt olarak kullanılıp örneklerdeki DNA parçacıklarının uzunluğu saptanabilmektedir. DNA ladder 123 bp’lik uzunluklar şeklinde jelde göçe uğramakta ve agarozda eşit aralıklı bantlar oluşturmaktadır. Örneğimizden elde edilen DNA bandı kendi hizasındaki marker’ın DNA bandı ile karşılaştırılarak bant

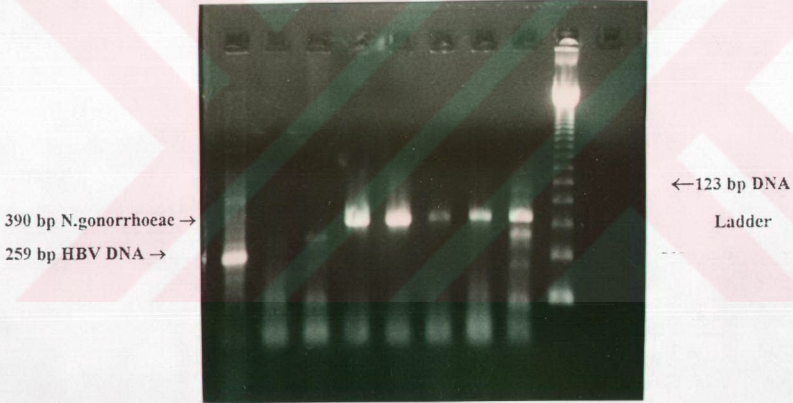
hedef DNA ile aynı uzunlukta bulunduğunda bunun *N.gonorrhoeae*' ya ait olduğu düşünöldü.

Elektroforez tamamlandıktan sonra ethidyum bromid boyalı jel ultraviyole ışığı altında incelendi ve 390 bp'lik fragmanın varlığı araştırıldı. 390 bp'lik *N. gonorrhoeae*'ya ait olduğu düşünölen PCR ürünü bant agaroz jelden kesilerek saflaştırıldı. Saflaştırmada ticari DNA pürifikasyon kiti (Promega, Wizard PCR Preps, DNA pürifikasyon systems, Madison, WI, USA) üreticinin önerdiği protokole uygun olarak kullanıldı. Daha sonra elde edilen DNA, MspI (Promega Madison WI, USA ) restriksiyon enzimi ile kesilerek tekrar %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

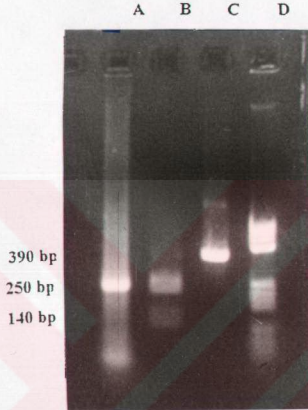
Bu işlem için 1µg. PCR ürünü DNA 10µl içerisinde resüspanse edildi. PCR ürünü DNA 30 ünite MspI enzimi ve enzim beraberinde bulunan tampon ile 1X halinde hazırlanıp reaksiyona 50µl volüm içerisinde devam edildi. Reaksiyon volümü 4 saat 37°C'de tutuldu. Elektroforez sırasında Hae III ile kesilmiş PBR 322 DNA markeri kullanıldı. Ethidyum bromid boyalı jel ultraviyole ışığı altında 390 bp'lik PCR ürününün referans alınan literatürde de belirtildiği gibi 250 ve 140 bp'lik iki fragmana bölündüğünü göstermek için incelendi.

**BULGULAR:**

Kırk sikluluk PCR reaksiyonunu takiben amplifiye edilen ürüne elektroforez yapıldı. Elektroforezden sonra Ethidyum bromid boyalı jelde ultraviyole ışığı altında incelendi. Literatürde de (14) belirtildiği gibi 390 bp'lik fragman saptanan örnekler *N.gonorrhoeae* olarak kabul edildi (Şekil 1).



Şekil 1: Agaroz jel elektroforeziyle *N.gonorrhoeae* PCR ürünlerinin gösterilmesi



Şekil 2: Restriksiyon enzimi MspI ile sindirilen *N.gonorrhoeae* PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi.

A:HBV PCR ürünü , B:Msp I ile sindirilmiş PCR ürünü , C:390 bp *N.gonorrhoeae* PCR ürünü , D:PBR 322 Hae III DNA marker

Elde edilen 390 bp'lik fragmandan saflaştırılan PCR ürününün restriksiyon enzimi MspI ile kesilerek elektroforezi yapıldığında referans literatürde belirtildiği gibi 250 ve 140bp'lik iki fragmana bölündüğü izlendi (14). (Şekil 2 )

Tablo 1: Örneklerin değişik hasta gruplarına göre dağılımı

GRUPLAR	SAYI	YÜZDE %
1	21	27,3
2	40	51,9
3	16	20,8
Toplam	77	100,0

1.grup risk grubu olup; yöremizdeki hayat kadınlarının oluşturduğu gruptur. Örnekler bu kadınların periyodik muayeneleri esnasında vaginal akıntı şikayetleri olup olmadığına bakılmaksızın alınmıştır.

2.grup vaginal akıntı şikayeti ile jinekoloji polikliniğe başvuran kadın hastalardan oluşmaktadır

3.grup üretral akıntı şikayeti ile üroloji polikliniğe başvuran erkek hastalardan oluşmaktadır.

Tablo:2 Kültür, PCR ve Gram boyama sonuçları

Sonuç	KÜLTÜR		PCR		GRAM BOYAMA	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Negatif	73	94.8	64	83.1	71	92.2
Pozitif	4	5.2	13	16.9	6	7.8
TOPLAM	77	100	77	100	77	100

Örneklerin değişik hasta gruplarında dağılımı tablo 1’de gösterilmiştir. Buna göre test örneklerinin çoğu vaginal akıntılı kadın hastalardan elde edilmiştir. Kültür, Gram boyama ve PCR deneylerinin sonuçları tablo 2’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Örneklere yapılan kültürlerin 4’ünde *N.gonorrhoeae* üredi. Altısında Gram boyalı preparatta Gram olumsuz diplokok saptandı ve toplam 13 örnekte PCR incelemesinde *N.gonorrhoeae* pozitif bulundu. Kültür sonucu pozitif olan 4 örneğin Gram boyaması ve PCR sonucu da pozitifdi. Gram boyalı preparatında Gram olumsuz diplokoklar izlenen iki olguda kültürde *N.gonorrhoeae* ürememesine karşılık PCR sonucu pozitif bulundu. Kalan 7 olguda kültür ve Gram boyama sonuçları negatif olmasına rağmen yapılan PCR incelenmesinde pozitif sonuç alındı.

Tablo 3: Gruplara Göre PCR Sonuçlarının Dağılımı:

GRUPLAR	NEGATIF	POZITIF	TOPLAM
1	18	3	21
2	38	2	40
3	8	8	16
toplam	64	13	77
yüzde	83,1	16,9	100,0

Tablo 4,5 ve 6 tüm hastalardan elde edilen sonuçlara göre düzenlenmiş ve istatistiksel analizler toplam hasta grubu üzerinde yapılmıştır. PCR sonuçlarının örnek alınan gruplardaki dağılımı da tablo 3'de gösterilmiştir. PCR sonuçları ayrıca mikroskopi ve kültür sonuçlarıyla da ayrı ayrı kıyaslanmış ve bu kıyaslamalar tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir. Kültür ve mikroskopi sonuçlarının kıyaslanması ise tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4:Tüm Grupta Elde Edilen Mikroskopi ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması:

		Mikroskopi sonuçları		Toplam
		Pozitif	Negatif	Sayı
PCR	Pozitif	6	7	13
sonuçları	Negatif	0	64	64
Toplam	Sayı	6	71	77

McNemar testi binomial olasılık hesabıyla  $p < 0,05$

Duyarlılık:  $6/6 = \%100$  Testin pozitif tahmin değeri:  $6/13 = \%46$

Özgüllük:  $64/71 = \%90$  Testin negatif testin tahmin değeri:  $64/64 = \%100$



Tablo 5:Kültür ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması:

		Kültür Sonuçları		Toplam
		Pozitif	Negatif	Sayı
PCR	Pozitif	4	9	13
Sonuçları	Negatif	0	64	64
Toplam	Sayı	4	73	77

$p < 0.01$

Duyarlılık:  $4/4 = \%100$  Testin pozitif tahmin değeri:  $4/13 = \%30$

Özgüllük:  $64/73 = \%87$  Testin negatif tahmin değeri:  $64/64 = \%100$

Tablo 6: Kültür ve Mikroskopi Sonuçlarının Karşılaştırılması:

		Kültür Sonuçları		Toplam
		Pozitif	Negatif	Sayı
Mikroskopi	Pozitif	4	2	6
Sonuçları	Negatif	0	71	71
Toplam	Sayı	4	73	77

$p > 0,05$

Duyarlılık:  $4/4 = \%100$  Testin pozitif tahmin değeri:  $4/6 = \%60$

Özgüllük:  $71/73 = \%97$  Testin negatif tahmin değeri:  $71/71 = \%100$



## TARTIŞMA

Gonore oldukça sık rastlanılan bir enfeksiyondur. 1970'lerde seksüel olarak aktif olan kadınlardan yapılan endoservikal kültürlerde %2 oranında bulunmuştur. 1974 yılında ABD'de 2700000 gonore vakası olduğu hesaplanmıştır. 1977 yılında ABD' de 469.6/100.000 olan bu oran ülkemizde 2.6/100000 dır. Yaygın olan bu enfeksiyonun ülkemizde bu kadar düşük olması bildirimlerin sağlıklı yapılmaması nedeniyle verilen sayının gerçekleri yansıtmamasına bağlı olabilir (10,34).

Erkek üretritlerinde N.gonorrhoeae bulunma sıklığını Yılboz ve ark. %21 (35), Beycan ve ark. %39,8 olarak bulmuşlardır (4). Aydın ve ark. 1997'de yayınladıkları çalışmalarında aynı oranı %7,5 olarak saptamışlardır (3). Gonore tanısı genellikle klinik olarak konulmakta ve tedaviye geçilmektedir. Bu durum laboratuvarında saptanan N.gonorrhoeae oranlarının gerçekte olduğundan daha düşük görünmesine yol açıyor olabilir (2). 16'sı erkek, 61'i kadın toplam 77 hasta üzerinde yaptığımız çalışmamızda, PCR uygulayarak N.gonorrhoeae saptadığımız hasta oranını %16,9 olarak bulduk. Aynı hasta grubunda kültürde N.gonorrhoeae varlığını gösterebildiğimiz hastaların oranı ise %5,2 idi. Yapılan istatistiksel değerlendirmede kültür ve PCR yöntemi kıyaslandığında aralarındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ) bulundu. Grubumuzda Gram boyalı preparat ile gonokok varlığı gösterilen hastaların oranı %7,8 bulundu ve PCR ile kıyaslandığında aralarındaki fark anlamlı ( $p<0,01$ ) bulundu. Bu veriler, önemli bir enfeksiyon etkeni olan N.gonorrhoeae'nın tanısında daha güvenilir testlere gerek olduğunu göstermektedir.

Gonorenin kesin tanısı üretral veya servikal akıntıdan yapılan yaymanın mikroskopik incelenmesi ve kültür çalışması ile konulur (34). Gram boyama hızlı sonuç veren bir testtir ve erkek hastalarda duyarlılığı

%90-98, özgüllüğü %95-98'dir (34,37). Ancak asemptomatik erkeklerde üretradan, rektumdan ve kadınlarda serviksten yapılan yaymalarda duyarlılık %50-60'a ve özgüllük %82-97'ye düşmektedir (22,34). Gram boyama pozitif dahi olsa tüm kadın hastalarda kültür çalışması yapılmalıdır (12,34).

Semptomatik üretritli erkeklerde üretral örnekler için kültür %95 duyarlı iken , kadınlarda endoservikal enfeksiyonlar için duyarlılığı %85'dir (12,34). N.gonorrhoeae saptanmasında kültür kesin tanı için gereklidir ve "gold standard" olarak kabul edilmektedir (14;24). Antibiyotik duyarlılığı ve  $\beta$ -laktamaz testinin uygulanabilirliği yönünden hala mutlaka yapılması gereken bir testtir (37). Ancak kültür yönteminin yalancı negatiflik verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (14,18). Kültür için 24-48 saatlik bir inkubasyon süresine gerek vardır ve örneğin transportu uzun sürerse bakteri canlılığını yitirmektedir. Ayrıca antibiyotik tedavisi başlanmış hastalarda kültürün duyarlılığı azalmaktadır (24). Örneğin sinoviyal sıvı gibi gonokokun zor ürediği materyallerde agar plaklarının ekim anındaki ısı bile kültür sonucunu etkileyebilmektedir (20) . Gonokokların az bir kısmı vankomisine aşırı duyarlıdır ve selektif ortamda kültür edildiklerinde yalancı negatiflik oluşturabilirler (37).

Hagman ve ark, yaptıkları çalışmada şüpheli gonoreli kadın ve erkeklerde doğrulama testleri ile birlikte kültürün yapılmasının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmada meningokokların da genitoüriner enfeksiyonlarda etken olabileceğini ve klinik ve tanısal yönden bir problem yaratabileceğini göstermişlerdir (11).

Bu klasik yöntemlerin yanı sıra ELİSA, DNA problemleri, monoklonal antikorla belirlenme gibi yöntemler de gonorenin tamsında

uygulanmaktadır. ELİSA (Gonozyme) kullanarak gonokokkal antijeni belirleme yöntemi hızlı bir testtir ve semptomatik erkeklerde yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterir. Ancak testin Gram boyamaya nazaran bir avantajı yoktur (16). Kadın hastalarda testin duyarlılığı düşüktür. Yalancı pozitif sonuçlar verebilir ve antibiyotik duyarlılığını gösteremez (1).

İmmunfloresans ile gonokokkal antijenin belirlenmesi için floresan antikor tekniği uygulanmaktadır. Hızlı bir testtir ve hem canlı hem de cansız mikroorganizmayı saptayabilmektedir. Floresan antikor prosedürü major dış membran proteini olan protein I üzerindeki epitoplara tanıyan monoklonal antikorları kullanmaktadır. Ancak test hasta örneklerinden mikroorganizmanın direkt tanınmasına yönelik tasarlanmamıştır. Ayrıca birkaç gonokokkal izolatın floresans vermeyebileceği gösterilmiştir (16).

Ridderhof ve ark. primer kültürden *N.gonorrhoeae*'yi tanımlamak için monoklonal Ab ve DNA prob testini karşılaştırmışlardır. Kültürde seçici ortamın duyarlılığını sürdürmek güçtür ve *Neisseria* grubundaki non-gonokokkal üyelerinde genital ve genital bölge dışında bulunabilmesi kültür sonucunda elde edilen izolatların *N.gonorrhoeae* olduğunun doğrulanmasını gerektirir. Bu amaçla kullanılan monoklonal antikor testinin duyarlılığı %94, özgüllüğü %100 bulunurken, DNA prob testi %95 duyarlı bulunmuş, ancak özgüllüğü yeterli (%65) bulunmamıştır (28).

Totten ve ark. DNA hibridizasyon tekniğini kullandıkları çalışmalarında inceledikleri 261 suşun %96'sında kriptik plazmid bulunduğunu göstermişlerdir ve kriptik plazmid problemleri kullanarak benzer gonokokkal suşları belirlemenin mümkün olabildiğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada hibridizasyon tekniğinin uzun ve zor

olduğunu klinik laboratuvarında hemen uygulanamayacağını ancak canlı olmayan bakteriyi belirlemede ve antibiyotik tedavisi altındaki hastalarda bakterinin gösterilmesi açısından uygun olabileceğini belirtmişlerdir (33).

Ürogenital örneklerde gonokokun belirlenmesi için DNA problemleri ile hibridizasyon yöntemi son yıllarda yaygın olarak araştırılmıştır. Prob olarak çeşitli nükleotit sekansları kullanılmıştır. Örneğin: Pilin geninin nükleotit sekansları kullanılmıştır ancak gonokokun pilin geninin birden fazla kopyası vardır ve meningokoklarınki ile benzerlik gösterir. Ayrıca IgA1 proteaz geni kullanılmıştır. Tüm gonokoklarda bu genin tek bir kopyası vardır ancak klinik örneklerde az sayıda mikroorganizma olduğunda belirlenmesi zordur. Bunlara ilave olarak rRNA derivesi oligonükleotit problemleri kullanılmış, bunlarla yapılan deneyin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Ancak bu probun tam sekansı yayınlanmamıştır (21).

DNA problemleri kullanarak antijen belirlenmesi etkin bir alternatif metoddur. Kültür, organizmanın laboratuvara canlı ve zamanında transportunu gerektirdiğinden, rekombinant DNA teknolojisi örneğin biriktirilebilme ve depolanma kolaylığını vermekte ve 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç veren hızlı bir tanı yöntemi sağlamaktadır. Alınan sonuçlar DNA prob testinin bir tarama ve tanı testi olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Ancak test yalancı negatif sonuçlar verebilmektedir<sup>31</sup>. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Ancak spesifik DNA sekanslarının seçimi zordur (21). Çünkü gonokok yüksek oranda (%80) N. meningitidis ile homoloji gösterir. Bu test genital bölge dışında uygulanamaz ve pahalı bir yöntemdir (24). Ayrıca kültür gerektirmeyen klasik yöntemlerden olan enzim immünoassay ve DNA prob hibridizasyon yöntemleri gonore tanısını koydurmakla beraber

PCR ve LCR gibi amplifikasyon yöntemlerinin özgüllüğüne yaklaşmamaktadırlar (6). Bütün bu tanı yöntemlerini gözden geçirdiğimizde gonore tanısında daha kesin sonuç veren hızlı ve güvenilir bir tanı metoduna gerek olduğu açıktır. Çalışmamızda günümüzde birçok hastalığın tanısında güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilen PCR'ın gonorede uygulanabilirliğini göstermeyi amaçladık.

Gonorenin PCR yöntemi ile belirlenmesinde uygun primerlerin seçimi testin en önemli basamağını oluşturmaktadır ve değişik primerler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Muralidhar ve ark. primer olarak ribozomal gen sekanslarını kullanmışlar ve sinoviyal sıvıda *N. gonorrhoeae*'yı göstermişlerdir (23).

Poh ve ark.. PCR yöntemiyle tüm hücreyi temel alan sekans temelinde IB-2 ve IB6 serovarlarını ayırabilmişlerdir (25).

Birkenmayer ve Armstrong 1992'de yaptıkları çalışmalarında Opa-2, Opa-3 ve pilin-2 proteinlerinin sekanslarını kullanarak LCR (Ligase chain reaction) ile üretral ve endoservikal örneklerde *N.gonorrhoeae*'nın varlığını göstermişlerdir. Ayrıca Opa-2 probunun sensitivitesini, Opa-3 ve pilin-2'den iki kez daha güçlü bulmuşlardır. Kültürle kıyaslandığında her üç proba yapılan testin duyarlılığının %100 ve özgüllüğünün %97.8 olduğunu göstermişlerdir (6).

Li ve ark. seksüel geçişli artritlerde bakteriyel DNA'yı belirlemek için *N.gonorrhoeae* klasII dış membran proteinini genine özgül primer kullanmışlar ve testin duyarlılığını %80 özgüllüğünü %98 olarak tesbit etmişlerdir. Tekniğin daha erken tanı sağladığını ve seksüel geçişli artritlerde antibiyotik tedavisinin etkinliğini araştırmada objektif bir ölçü olduğunu saptamışlardır (19).

Liebling ve ark.. gonokokkal dış membran proteini proteinIII'ün yapısal gen ürünlerini primer olarak nested PCR yöntemiyle sinoviyal sıvıda çalışmışlar ve testin duyarlılığını %96.4 özgüllüğünü %78.6 bulmuşlardır. Nested PCR yönteminde ilk PCR'ın uygulandığı amplifiye ürün tekrar benzer primerlerle amplifiye edilmektedir. Sonuçta amplifikasyon ile çok sayıda hedef molekül oluşmakta ve herhangi bir yalancı negatiflik olmadan kolayca gözlenebilmektedir. Nested amplifikasyon ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Testin duyarlılığın çok yüksek olmasına bağlı bir dezavantajı vardır; birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci tüpe aktarılırken ürün çok az miktarda dahi çevreye saçılacak olursa sonraki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir (8). N.gonorrhoeae artritinin, akut Reiter sendromundan ayrılmasında bu tekniğin yardımcı olduğu kanıtlanmıştır. Standart kültür ile sinoviyal sıvılarında üreme olmayan hastaların kesin tanısında PCR'ın uygulanabilir olduğunu gösterilmiştir (20).

Lau ve ark.. N.gonorrhoeae'nun dış membran proteini PIB'i kodlayan genin 341 bp'lik bir fragmanını kullanarak PCR uygulamışlar ve bu tekniğin PIB serovarları için duyarlı ve özgül olduğunu tesbit etmişlerdir. Ancak PIA için bu primerlerin aynı duyarlılığı göstermediklerini bulmuşlardır. Bu yöntemle yaygın bir serovara ait daha fazla suşu ayırt edebileceği öne sürülmüştür (18).

Deguchi ve ark.. 16S'lik ribozomal RNA sekanslarını kullanarak üretral örneklerde PCR ile N.gonorrhoeae araştırmış ve deneyin gonokokkal üretritlerin tanısında kullanılabileceğini, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğunu belirtmişlerdir (7). Qu ve ark.. şüpheli gonokokkal üretritli hastalarda yaptıkları çalışmalarında



kültür ve gram boyama pozitif, ancak PCR negatif sonuçlu vakalara rastlamadıklarını ama bunun yanında kültürde üreme saptanmayan 6 hastada PCR pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak gonokokkal üretritlerin tanısında özellikle de kronik enfeksiyonlarda PCR'in rutin yöntemlerden daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (26).

Gonokoklar çok sayıda plazmide sahiptirler, bunların en küçüğü 4,2 kb'lik kriptik plazmidir, ve fonksiyonu tam bilinmemektedir. Hangblom ve ark. yaptıkları çalışmada 4,2 kb.'lık kriptik plazmidin *N.gonorrhoeae* klinik izolatlarının %96'sında bulunduğunu gösterdiler. Bu plazmidin DNA'sı kromozoma integredir ve plazmidsiz suşlarda da bulunmaktadır (13).

Koch ve Hangblom daha önceki çalışmalarında kriptik plazmid pJD<sub>1</sub>'in tam nükleotit sekansını rapor etmiştir (17). Ho ve ark. tam nükleotit sekansı bilinen kriptik plazmidi hedef nükleotit olarak seçmişler ve kriptik plazmidin cppB geninin 390 bp'lik bir DNA fragmanını taşıyan *N.gonorrhoeae* için bir PCR deneyi geliştirmiştir. Sonuçta testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %88,9 olarak tesbit etmişlerdir (14). Bu çalışmada aynı primerler kullanılarak üretral ve servikal örneklerde PCR uygulanmış ve duyarlılık %100, özgüllük %90 olarak tesbit edilmiştir. Bu oranlar daha önce yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunun değerlendirilmesinde böylesine iyi sonuçlar alınmasına rağmen testin rutin tanıda alabileceği yeri kestirmek güçtür. Bu tarz bir sonuca varabilmek için bu testin rutin testlere göre avantaj ve dezavantajlarının çok iyi değerlendirilmesi gerekir. Gonorenin ön tanısında Gram boyamanın önemli bir yeri olduğu açıktır. Gram boyama ucuz bir yöntemdir, hızlı sonuç alınır ve bu testin PCR ile yer değiştirmesi olası değildir. Gram boyama yönteminde yeterli

üretal veya servikal eksuda olmalıdır. Ayrıca, gram boyama kadın hastalarda erkeklerde olduğu kadar duyarlı değildir. PCR yönteminde uygun alınan örnek yeterlidir. Asemptomatik erkek ve semptomatik veya asemptomatik kadın hastalarda güvenle uygulanabilmektedir (6,14,32). Asemptomatik hastalarda Gram boyamanın duyarlılığı %40'a kadar düşmektedir. Tanı konuluncaya kadar geçen süre enfeksiyonun bulaşmasında önemli olduğu gibi çeşitli komplikasyonların gelişmesi için yeterli süreyi de sağlayabilir.

Gonokoklar çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlere duyarlı organizmalardır. Kültürde seçici ortamın duyarlılığını sürdürmedeki güçlükler, non-gonokokkal üyelerin materyal alınan bölgede bulunması kültür sonuçlarını etkilemektedir (28). Örneğin transportundaki güçlükler bakterinin canlılığını yitirmesine sebep olabilir. Örnek transportunda taşıma besiyerleri kullanılabilir ancak bu şekilde yapılan kültürde üreme oranı direkt hasta başında yapılabilecek nazaran düşük olmaktadır (20). Oysa PCR için alınan örnek fosfat tampon içerisinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bir ay kadar bekletilebilmektedir. Bu özellik transport problemini ortadan kaldıracaktır, örneklerin biriktirilerek incelenmesine ve tekniğin olmadığı yerlerden referans laboratuvarlarına materyalin gönderilebilmesine olanak sağlar. Örnek alınan bölgede bakteri sayısı yetersizse kültür sonuç vermemektedir, antibiyotik tedavisi almış hastalarda kültürün duyarlılığı azalmaktadır. Yapılan çalışmalar PCR'ın 390 bp'lik fragman kullanılarak 500 cfu *N.gonorrhoeae*'yi belirleyebilecek duyarlılıkta olduğunu göstermiştir (14). Ayrıca antibiyotik tedavisi almış hastalarda PCR duyarlılığı değişmemektedir (31).

Bu çalışmada yapılan çalışmalar değerlendirilerek en uygun primer olarak plazmid orijinli cppB geninin 390 bp'lik DNA fragmanı



seçilmiştir. Ho ve ark. 1992 yılında yapmış oldukları çalışmalarında testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %88,9 bulmuşlardır (14). Bu çalışmada kültür yöntemine kıyasla testin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %87 bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük önceki verilere uygunluk göstermektedir. Testin pozitif tahmin gücü %30, negatif tahmin gücü ise %100 saptanmıştır. Pozitif tahmin gücünün düşük bulunması, 9 örnekte kültür sonucunun negatif olmasına bağlı olabilir. Kültür sonucu negatif ancak PCR da *N.gonorrhoeae* saptanan bu 9 hastanın tümünde üretral akıntı, bel ağrısı, dizüri ve vaginal akıntı gibi klinik bulgular mevcuttu. Ayrıca bu 9 hastanın ikisinde *U.ürealiticum* ve *S.aureus*, birinde *U.ürealiticum* ve *C.albicans* üredi. Ancak diğer altı örnekte başka bir etken izole edilmedi.

Örnekler PCR işlemleri sırasında laminar flowa sahip biyolojik güvenlik kabininde tutulmuştur. Dolayısıyla çapraz kontaminasyon riski en aza indirilmiştir. Ayrıca her örnek grubu içinde pozitif ve negatif kontroller bulundurulmuş ve kontrollerin sonuçlarına göre test sonuçları değerlendirilmeye alınmıştır. Bu nedenle, deney sırasındaki kontaminasyon ihtimali ortadan kaldırılmıştır.

Yetersiz bakteri sayısı, beraberinde diğer genital enfeksiyon ajanlarının bulunması ve hastaların antibiyotik tedavisi almış olması gibi etkenler kültür sonucunu etkilemiş olabilir. Çoğu çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da PCR kültürün belirleyemediği pozitif örnekleri ayırt edebilmiştir. Sonuçta testin duyarlılığı ve özgüllüğü kültürden daha yüksek bulunmuştur. Kültür pozitif bulunan hiçbir örnekte PCR negatif bulunmamıştır, diğer bir deyişle yalancı negatif sonuç alınmamıştır. PCR dışındaki tanısal testler semptomatik hastalarda veya yüksek risk grubunda daha iyi sonuç verirken asemptomatik hastalarda ve düşük

prevalans gösterenlerde daha az etkilidirler. Söz edilen bu gibi durumlarda da PCR yüksek duyarlılığa sahiptir (14,20). PCR özellikle besiyerine duyarlılık, yetersiz transport koşulları veya yetersiz miktarda örnek alımı gibi nedenlerle kültür sonuçları negatif olduğunda kesin tanıyı vermesi açısından yararlıdır. Kültürde alınan negatif sonuç kesinleştirilemezken PCR ile alınan negatif sonuç kesindir (31). Bunların yanı sıra kronik ve asemptomatik enfeksiyonlarda kültürle tanıya gitmek güçtür . Bu gibi durumlarda PCR tercih edilebilir. Kültür hastalığın klinik gidişini izleyebilme ve antibiyogram yapabilme şansını vermektedir. Bu iki özellik kültürün gonore tanısındaki yadsınamaz önemini vurgulamaktadır. PCR'ın gonore tanısında "gold standart" olarak kabul edilen kültürün tanısal gerekliliğini ortadan kaldırmasının mümkün olmadığı açıktır. PCR sinoviyal sıvı, peritoneal sıvı, tubal biyopsi örnekleri gibi kültürün yeterli sonuç vermediği örneklerde de yararlı olabilir.

PCR'ın pahalı bir tanı yöntemi olması, uygulama için tam donanımlı bir laboratuvar gerektirmesi ve tedaviye yön vermede yetersiz kalması dezavantajları olarak sayılabilir. Sonuç olarak PCR iyi bir alternatif tanı yöntemi olarak değerlendirilmelidir.

## Kültür ve PCR yönteminin farkları:

	<b>Kültür</b>	<b>PCR</b>
Transport	Önemli	Önemli değil
Kültür ortamı	Önemli	Önemli değil
Örneğin bekletilebilmesi	Bekletilmemelidir	Bekletilebilir
Test performansı	İyi	İyi
Test yöntemi	Basit	Komplike
Sonucu değerlendirme	Objektif	Objektif
Enstrümantasyon	Mikroskop	PCR düzeneği
Laboratuvarı iş yükü	Arttırmaz	Arttırır
Antibiogram	Yapılır	Yapılmaz
Genital bölge dışı kullanım	Kullanılır	Kullanılır
Cansız organizma saptama	Yapamaz	Yapar
Testin maliyeti	Ucuz	Pahalı

## SONUÇ:

Bu çalışmada PCR deneyinin tanısal seçiciliği yüksek bulunmuştur. Ayrıca diğer yöntemlerle arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Bu özellikler PCR'ın tanısal önemini arttırmaktadır. PCR ile karşılaştırılan rutin tanı yöntemleri Gram boyama ve etkenin kültürde izolasyonudur. Gram boyama ucuz, hızlı ve kolay bir yöntemdir ancak hastalığın kesin tanısını vermede yetersizdir. Kültür yaparak etkenin izolasyonu standart bir yöntemdir. Ancak sonuç alınması için geçen süre uzundur. Gram boyamaya kıyasla kültür yöntemi duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Antibiyogram yapılabilmesi kültürün avantajını arttırmaktadır. PCR ise kültüre nazaran daha kesin sonuç alınan bir test olarak değerlendirilmektedir. Ancak pahalı bir yöntemdir. Rutin tanı yöntemi olarak kültürün yerini alabileceği söylenemese de alternatif bir tanı yöntemi olarak yerini koruyabileceği öne sürülmektedir. Özellikle kronik enfeksiyonlularda ve asemptomatik hastalarda rutin tanı yöntemlerinin içinde değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1-Aydemir, E.H. (1988). Gonore ve Sifilizin Dünyada ve Ülkemizde Durumu. Klimik Dergisi., (Özel Sayı 1), 202-210 .
- 2-Aydın,M D., Erdogdu, T., Ağaçfıdan, A., Güvener, Z..ve Ordu, A.. (1997). Erkek Üretritinde Major Bakteriyel Etkenlerin Bulunma Sıklığı. İnfeksiyon Dergisi., 11, 275-278.
- 3-Aydın, M.D., Ağaçfıdan, A., Ordu, A., Alp, T., Erdoğan, T. ve Güvener, Z. (1995). Erkek Üretritinde Major Bakteriyel Etkenlerin Bulunma Sıklığı.5. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları kongresi,4-6 Eylül İstanbul, Kongre Kitabı:s111
- 4-Beycan, İ., Fazhoğlu, A., Gürbüz, G. ve Çek, M.. (1996). Semptomatik Üretritli 309 Erkek Hastanın Etyolojik Etkenlerin Prevalansı XXVII Türk Mikrobiyoloji Kongresi ,7-10 Mayıs,Antalya kongre Kitabı: s210
- 5-Bilgehan,H. (1992). Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 245-54, 7.baskı., Barış yayınları ve Fakülteler kitapevi, İzmir,
- 6-Birkenmeyer, L. And Amstrong, A.S. (1992). Preliminary Evaluation of the Ligase Chain Reaction for Spesific Detection of Nesseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol., 30, 3089-3094.
- 7-Deguchi, T., Yamamoto, H., Tada, K., Komeda, H. ve Iwata, H., (1992 ). Detection of Neisseria gonorrhoeae from Male Patient with Urethritis by Polymerase Chain Reaction, Konsenshogaku Zasshi., 66, 555-560.
- 8-Durmaz, R. (1995). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Teknolojisi ve Mikrobiyolojide Kullanımı, Mikrobiyoloji Bülteni., 29, 304-320.
- 9-Gedikoğlu,S.(1994).Neisserialar.s.33-41..Ed.Kılıçturgay,K.in:“Klinik Mikrobiyoloji”, Güneş-Nobel Tıp Kitapevi, Bursa,
- 10-Güray, Ö. (1988).Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıkların Sosyo-Epidemiyolojik Durumu,.Klimik Dergisi , (Özel Sayı 1), 160-167.

- 11-Hagman, M., Forslin, L., Moi, H. and Danielson, D. (1991). *Neisseria meningitidis* in Specimens from Urogenital Sites. *Sexually Transmitted Diseases*, 18,228-232.
- 12-Handsfield, H.H. and Sparling, PF. (1995). *Neisseria Gonorrhoeae*. P.1909-1926 . Eds Mandell, G.L., Bennett. J.E., Dolin. R.In “Principles and Practice of Infectious Diseases”, Churchill Livingstone Inc, New York.
- 13-Hangblom, P., Kroch, C., Jonsson, A.and Normark, S. (1986). Intragenic Variation by Site-specific Recombination in the Cryptic Plasmid of *Neisseria gonorrhoeae* *J. Bacteriol.*, 167, 231-237.
- 14-Ho, BSW., Feng, WG., Wong, BKC.and Egglestone, SI. (1992). Polymerase Chain Reaction For the Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Clinical samples. *J.Clin. Pathol.*, 45, 439-442.
- 15-Jawetz, E, Melnick, L.J., Adelberg, A.E., Brooks, G.F., Butel, S.J.and Ornston,N.L.(1989). P.239-42, 18.thEd., *Medical Microbiology*, Appleton&Lange, California.
- 16-Koneman, E.W., Allen, S.D., Schreckenberger, P.C., Washington, C.W. (1992). P.369-404, Fourth Ed., *Diagnostic Microbiology*, J.B Lippincott Company, Philadelphia,
- 17-Korch, C., Hangblom, P., Ohman, H., Goransson, M. And Normark, S. (1985).Cryptic Plasmid of *N.gonorrhoeae*: Complete Nucleotit Sequence and Genetic Organization, *Journal of Bacteriology.*, 163, 430-438.
- 18-Lau, Q., Chow, V.T.C. and Poh, C.L. (1993). Polymerase Chain Reaction and Direct Sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* Protein IB gene: Partial Nucleotide and Amino Acid Sequence Analysis of Strains S<sub>4</sub> , S<sub>11</sub> ,S<sub>48</sub> , (serovar IB<sub>4</sub> ) and S<sub>34</sub> (Serovar IB<sub>5</sub> ), *Med. Microbiol. and Immunol.*, 182, 137-145

- 19-Li, F., Bulbul, R., Schumacher, H.R., Kieber, T. and Callegari, P.E., (1996). Molecular Detection of Bacterial DNA in Veneral- Associated Arthritis. *Arthritis & Rheumatism.*, 39, 950-958.
- 20-Liebling, M.R., Arkfeld, D.G., Michelini, G.A., Nishio, M.J. and Eng, B.J., (1994). Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in Synovial Fluid Using the Polymerase Chain Reaction. *Arthritis & Rheumatism.*, 37, 702-709.
- 21-Miyada, C.G. and Born, T.L. (1995). A DNA Sequence for the Discrimination of *Neisseria gonorrhoeae* from other *Neisseria* Species. *Mol. Cell. Probes.*, 5, 327-335.
- 22-Morse Stephen, A. and Holmes King, K, (1989). Gonococcal Infections. P.639-654. In "Infectious Diseases" Hoeprich, P.D., Jordan, C.M., J.B. 4.th Ed. Lippincott Company, Philadelphia
- 23-Muralidhar, B., Rumore, P.M., Steinman, C.R.: Use of the Polymerase Chain Reaction to study Arthritis due to *Neisseria Gonorrhoeae*. *Arthritis & Rheumatism.*, 37, 710-17. (1994).
- 24-Panke, E.S., Yang, L.I., Leist, P.A., Magevney, P., Fry, J.R., and Lee, R.F. (1991). Comparison of Gen-Probe DNA Probe Test and Culture for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Endocervical Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 883-888.
- 25-Poh, C.L., Ramachandran, V. and Tapsall, J.W. (1996). Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* IB-2 and IB-6 Isolates Revealed by Whole-Cell Repetitive Element Sequence-Based PCR, *Journal Clinic Microbiol.*, 34, 292-295.
- 26-Qu, X.Z., Zhu, J.C. and Hou, SK. (1994). Application of Polymerase Chain Reaction in Diagnosis of Gonococcal Urethritis. *Chung Hua I Hseueh Tsa Chih.*, 74, 659-661.

- 27-Rest, F.R. and Frangipane, J.V. (1992). Growth of *Neisseria gonorrhoeae* in CMP-N Acetylneuraminic Acid Inhibits Nonopsonic (Opacity-Associated Outer Membrane Protein- Mediated) Interactions with Human Neutrophils, *Infection and Immunity.*, 60, 989-997.
- 28-Ridderhof, J.C., Vaughan, M., Tinney, A., Meier, F.A. and Dalton, H.P. (1990). Two Confirmatory Tests for Identification of *Neisseria gonorrhoeae* from Primary Culture, *J.Clin Microbiol.*, 28, 619-620.
- 29-Rossau, R., Duhamel, M., Vandyck, E., and Piot, P. (1990). Evaluation of An rRNA-derived Oligonucleotide Probe for Culture Confirmation of *Neisseria gonorrhoea*, *J. Clin Microbiol*, 28, 944-948.
- 30-Stam., W.E., Cole, B., Fennell, C. and Bonin, P., (1984) Antigen Detection for the Diagnosis of Gonorrhoea, *J.Clin Microbiol.*, 19, 399-403.
- 31-Tabrizi, S.N., Lees, M.I. and Garland, S.M. (1993). Comparison of Polymerase Chain Reaction and Culture Techniques for Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Molecular and Cellular Probes.*, 7, 357-360 .
- 32-Torres, M.J., Cano, R. and Palomeras, J.C. (1991). Evaluation of a DNA Probe of Plasmid Origin for The Detection of *N.gonorrhoeae* in Cultures and Clinical Specimens, *Molecular and Cellular Probes.*, 5, 49-54.
- 33-Totten, P.A., Holmes, K.K., Hansfield, H.H., Knapp, J.S., Perine P.L. and Falkow, S. (1988). DNA Hybridization Technique for the Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Men with Urethritis, *J. Infect, Dis.*, 148, 462-471.
- 34-Ünal, S. (1993) Cinsel temasla bulaşan hastalıklar. (1993) P.223-261, Ed. Kanra, G., Akalın, E., in. "İnfeksiyon Hastalıkları: Akut Bakteriyel İnfeksiyonlara Yaklaşım" İkinci baskı, Güneş Kitabevi, Ankara,
- 35-Yılboz, N., Şengör, F., Taşçıoğlu, J., Erol, A. and Bakırcıoğlu, E. (1995) Ürogenital Sistem Yakınması Olan Erkek Hastalarda Gonokoksik ve



Nongonokoksik Üretrit Etkenleri, 5.Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi,4-6 Eylül,İstanbul. Kongre Kitabı:s111.

36-Yücel, O.ve Yücel, N. (1997). Cinsel Yolla Bulaşan İnfeksiyonlar P. 316-20 Ed. Felek,S., in “Sistemik İnfeksiyon Hastalıkları”, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul,

37-Zenilman, J.and Wiesner, P.J. (1991). Gonococcal Infections. P. 255-76, Ed. Evans, A.S., Branchman, P.S.,in “Bacterial Infections of Humans Epidemiology and control”, 2 nd ed., Plenum Medical Book Company, Newyork,



## ÖZET

Bu çalışmanın amacı; polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak üretral ve servikal örneklerde *N.gonorrhoeae*'nin varlığını araştırmaktır.

Seçilen cppB primerler ile 77 klinik sürüntü örneğinde PCR yapıldı. 13 örnekte 390bp'lik amplifiye ürün gözlemlendi. Bu ürünlerin her biri restriksiyon enzimi MspI ile kesildi ve sırasıyla 250bp ve 140bp'lik iki bant elde edildi. Yetmişyedi örneğin 4'ü kültür ve 6'sı Gram boyama pozitif ve bu pozitif örneklerin tümü PCR da pozitif olarak belirlendi. Ayrıca kültür negatif olan 9 örnek için PCR pozitif.

Sonuç olarak PCR deneyi klinik sürüntü örneklerinde direk olarak *N.gonorrhoeae*'yi belirlemede ümit verici tanısal bir test olarak bulunmuştur.

## SUMMARY

The aim of this study is to analyse urethral and cervical samples for the presence of *N.gonorrhoeae* using polymerase chain reaction (PCR). PCR assay was performed on 77 clinical samples to evaluate the specificity of the chosen *cppB* primers. An amplified product of 390 bp was observed in 13 samples and each of these products after digestion with the restriction enzyme *MspI* produced two bands of 250 bp and 140 bp . Of the 77 clinical samples, 4 were culture positive and 6 were Gram stain positive and PCR successfully detected all these positives. Additionally, Gram staining negative 7 samples and Gram staining positive but culture negative 2 samples were found to be positive in PCR assay.

In conclusion PCR assay is a promising alternative diagnostic tool for detection of *N. gonorrhoeae* directly from clinical samples.

## ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Ankara'da doğdum, ilk öğrenimimi Ankara Bahçelievler ilkokulunda, orta öğretimimi ise Ankara Bahçelievler Deneme lisesinde tamamladım.1989 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesini bitirdim. Mezuniyetimden sonra Ankara Numune Hastanesi acil servisinde daha sonra sağlık ocağında pratisyen hekim olarak çalıştım.1992 yılında mikrobiyoloji anabilim dalında doktora programına başladım. Aynı zamanda hekim olarak çalışmayı sürdürdüm. 1996 yılından beri Fırat Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulunda öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bana gösterdikleri destek ve katkılarından dolayı başta Doç.Dr.Mehmet Ziya Doymaz olmak üzere değerli hocalarım; Prof.Dr.Mustafa Yılmaz'a, Doç.Dr.Zülal Aşçı'ya, Y.Doç.Dr.Vedat Bulut'a, Y.Doç.Dr.Handan Akbulut'a laboratuvar çalışmalarındaki değerli katkılarından dolayı Uz.Dr.Ahmet Kizirgil'e, Bio.Dr.Selma Ay'a ve Serhat Özdemir'e teşekkür ederim.



