

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

CHLAMYDIA TRACHOMATIS TANISINDA KULLANILAN
HÜCRE KÜLTÜRÜ, HİBRİDİZASYON VE DİREKT FLÖRESAN
ANTİKOR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Elçin AKDUMAN

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Talat ECEMİŞ

Manisa, 2007

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

CHLAMYDIA TRACHOMATIS TANISINDA KULLANILAN
HÜCRE KÜLTÜRÜ, HİBRİDİZASYON VE DİREKT FLÖRESAN
ANTİKOR TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Elçin AKDUMAN

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Talat ECEMİŞ

Manisa, 2007

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim sürecinde değerli katkılarından dolayı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Talat Ecemiş'e, tez çalışmalarım için laboratuvar imkanlarını sağlayan ve her aşamasında destek olan Doç. Dr. Candan Çiçek'e, tez için gerekli örnekleri sağlamada büyük yardımları olan Prof. Dr. Sermet Sağol'a, teknik bilgi ve yardımlarından dolayı Dr. Eylem Karataş, biyolog Nur Tarhan ve Yelda Utangaç'a,

Eğitim ve sağladıkları olanaklarla yetişmemde emeklerini asla unutamayacağım değerli hocam ve anabilim dalı başkanım Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na, değerli hocalarım Prof. Dr. Beril Özbakkaloğlu, Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ, Doç. Dr. Kenan Değerli, Doç. Dr. Semra Kurutepe, Yrd. Doç. Dr. Sinem Akçalı, Yrd. Doç. Dr. Nuri Özkütük ve Yrd. Doç. Dr. Hörü Gazi'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve onur duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Erdinç Aktaş, Dr. Eda Ünlü, Dr. Nilüfer Pekintürk, Dr. Aslı Teker, Dr. Emine İnmez, Dr. Müge Karakayalı, Dr. Sinan Karakadioğlu ve sevgili teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve ablama,

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Elçin Akduman

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ

ŞEKİL LİSTESİ

GRAFİK LİSTESİ

FOTOĞRAF LİSTESİ

KISALTMALAR

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. Biyoloji	3
II.2. YaşamDöngüsü.	3
II.3. Antijenik Yapı	5
II.4. Epidemiyoloji	6
II.5. Klinik	7
II.6. Laboratuar Tanı	9
II.7. Tedavi	16
III. GEREÇ VE YÖNTEM	18
III.1. Olgu seçimi ve örnek alınması	18
III.2. Hücre kültürü ile <i>C. trachomatis</i> aranması	19
III.3. DFA ile antijen aranması	24
III.4. <i>Chlamydia Trachomatis/Neisseria Gonorrhoeae</i> Hibridizasyon testi (PACE 2 CT/NG)ile antijen aranması	26
III.5. Test sonuçlarının analizi	30
IV. BULGULAR	32
V. TARTIŞMA	40
V.1. Görülme sıklığı	40
V.2. Yöntemlerle ilgili uygulamada karşılaşılabilecek olası sorunlar	42
V.3. DFA sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi	45
V.4. PACE 2 CT/NG sonuçlarının karşılaştırmalı çözümlemesi	46
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
VII. ÖZET	51
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	53
IX. EKLER	55
X. KAYNAKLAR	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Testlerin pozitif ve negatif sonuçları	34
Tablo 2: Çalışma popülasyonuna ait anket verilerinin değerlendirilmesi	36
Tablo 3: Tablo 1: PACE 2 CT/NG Ve Hücre Kültürü İle Elde Edilen Sonuçlar	37
Tablo 4: Tablo 2: DFA Ve Hücre Kültürü İle Elde Edilen Sonuçlar	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1- <i>C. trachomatis</i> Gelişim Döngüsü	4
--	---

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: <i>C. trachomatis</i> Üremesi Saptanan Olguların Yaşlara Göre Dağılımı	34
--	----

FOTOĞRAF LİSTESİ

Fotoğraf 1: McCoy hücre kültüründe üretilmiş <i>C. trachomatis</i> inklüzyon cisimcikleri (x400)	33
--	----

KISALTMALAR

BMGK: Buffalo yeşil maymun böbrek hücresi

CT: *Chlamydia trachomatis*

CTM: Klamidiyal taşıma ortamı

DFA: Direkt flöresan antikor

DNA: Deoksiribonükleik asit

EC: Elementer cisim

EIA: Enzim immunoassay

EMEM: Eagle minimal esansiyel ortamı

FCS: Fetal calf serum

FITC: Florosein isotiyosiyanat

GM: Üretim ortamı

GN: Gerçek negatif

GP: Gerçek pozitif

HIV: Human immunodeficiency virus

HSPs: Isı şok proteinleri

IgA: İmmunglobulin A

IgG: İmmunglobulin G

IgM: İmmunglobulin M

LCR: Ligaz zincir reaksiyonu

LGV: Lenfogradüloz venerum

LPS: Lipopolisakkarid

MIF: Mikro immunofloresan

MM: Maintenance medium

MOMP: Major dış zar proteini

NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri

NG: *Neisseria gonorrhoea*

NPD: Negatif prediktif değer

OIA: Optik immunoassay
OMP: Dış zar proteinleri
PBS: Fosfat tamponlu tuz
PCA: Probe competition assay
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PID: Pelvik inflamatuvar hastalık
PNL: Polimorfonükleer lökosit
PPD: Pozitif prediktif değer
RC: Retiküler cisim
RNA: Ribonükleik asit
TMA: Transcription mediated amplification
YN: Yalancı negatif
YP: Yalancı pozitif

I.GİRİŞ

Klamidyalar, genitoüriner, oküler, solunum sistemi gibi bölgelerde insanlarda çeşitli infeksiyonlara yol açan mikroorganizmlardır. Zorunlu hücre içi organizmalar olan klamidyaların yer aldığı *Chlamydiaceae* ailesi içinde 2 cins bulunur. 1) *Chlamydia* (*C.trachomatis*, *C. muridarum* ve *C. suis*) 2) *Chlamydophila* (*C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. abortus*, *C. caviae* ve *C. felis*) (1). *C.trachomatis*, *C. pneumoniae* ve *C. psittaci* insanda en sık infeksiyona neden olan türlerdir (2).

Eskiden beri bilinen ve Mısır'da Ebers kitabelerinde tarif edilen "Mısır Hastalığı" da denilen trahom, orta Asya'dan başlayarak savaşlarla Avrupa'ya yayılmıştır. Ancak hastalığın etkeni hakkındaki ilk bilgiler Halberstaedter ve von Prowazek ve arkadaşları tarafından 1907 yılında bildirilmiştir. Araştırmacılar Java'lı trahomlu bir hastadan alınan klinik örneği maymun konjunktivasına inoküle etmişler ve infeksiyondan alınan eksüdayı Giemsa yöntemi ile boyayarak intrastoplazmik inklüzyon cisimciklerini göstererek, bu elementer yapıları "*Chlamidozoa*" olarak adlandırmışlardır. Aynı araştırmacılar 1909 yılında non-gonokokkal oftalmia neonatarum'lu bebeklerin annelerinin servikal epitel hücrelerinden ve non-gonokokkal üretritli erkek hastalardan aldıkları klinik örneklerde inklüzyon cisimciklerini göstererek, trahom ile okülo-genital infeksiyona aynı etkenin neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lenfogradüloz venereum (LGV), ilk olarak 1913 yılında Durand, Nicolas ve Favre tarafından bildirilmiştir (3,4). 1965 yılında, Gordon ve Quan adlı araştırmacılar *C. trachomatis*'i hücre kültüründe izole etmişlerdir. 1965–1969 yılları arasında yapılan çalışmalarda, *C. trachomatis*'in replikasyon,

metabolizma ve genetik materyal açısından zorunlu hücre içi bir bakteri olduğu bildirilmiştir (5–8). 1970 yılında Wang ve Grayston tarafından mikroiimmünfluoresan (MIF) yöntemi ile klamidyia antikollarının saptanması gerçekleştirilmiştir. Böylece serotiplendirme ile *C. trachomatis*'in tanısında reform sayılabacak bir yol açılmıştır. 1980'li yıllarda *C. trachomatis*'in tanısı için geliştirilmiş olan enzim immunoassay (EIA), DFA gibi hızlı testler hücre kültürünün yerini almaya başlamıştır (4).

C. trachomatis kadın ve erkeklerde başta belirtili ve belirtisiz genito-üriner infeksiyonlar olmak üzere, trahom, inklüzyon konjunktiviti, lenfogradüloza venerum etkeni olan ve hücre içi çoğalan bir bakteridir. Özellikle cinsel yolla bulaşan hastalıklar içinde *C. trachomatis* dikkat çekicidir ve batı ülkelerinde gonokok infeksiyonlarını geçerek birinci sırada yer almıştır. Klamidyia infeksiyonlarının bir komplikasyonu olarak gelişen pelvik inflamatuvar hastalık (PID) ve sonrası komplikasyonları kadınlarda infertiliteye neden olabilmektedir.

Klamidyia infeksiyonlarının klinik tanısı nispeten zordur. Hücre kültürü klamidyia infeksiyonlarının tanısında altın standart yöntemdir. Ancak hücre kültürünün özellikle zahmetli bir test olması ve materyalin alımında yetersizliklerin söz konusu olabilmesi, rutin laboratuvarlarda diğer testlerin kullanılmasını teşvik etmiştir. Son yıllarda gelişen moleküler yöntemler ve duyarlılığı daha düşük olarak bildirilen serolojik yöntemler rutin laboratuvarlarda daha fazla tercih edilmektedir. Göreceli olarak daha zor bir teknik olan hücre kültürünün fiyat avantajı ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğü bu yöntemin üstünlüğünü korumaya devam ettirmektedir. Bu çalışmada; servikal akıntılı kadınlarda; *C. trachomatis*'in hücre kültürü, DNA hibridizasyon ve DFA testleriyle tespit edilmesi ve bu testlere ait duyarlılık, özgüllük ve etkinliğinin saptanması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışma ile elde edilecek infertil hastalardaki *C. trachomatis* prevalansı da, bu hastalığın klinik yaklaşımına ve değerlendirilmesine ışık tutacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Biyoloji

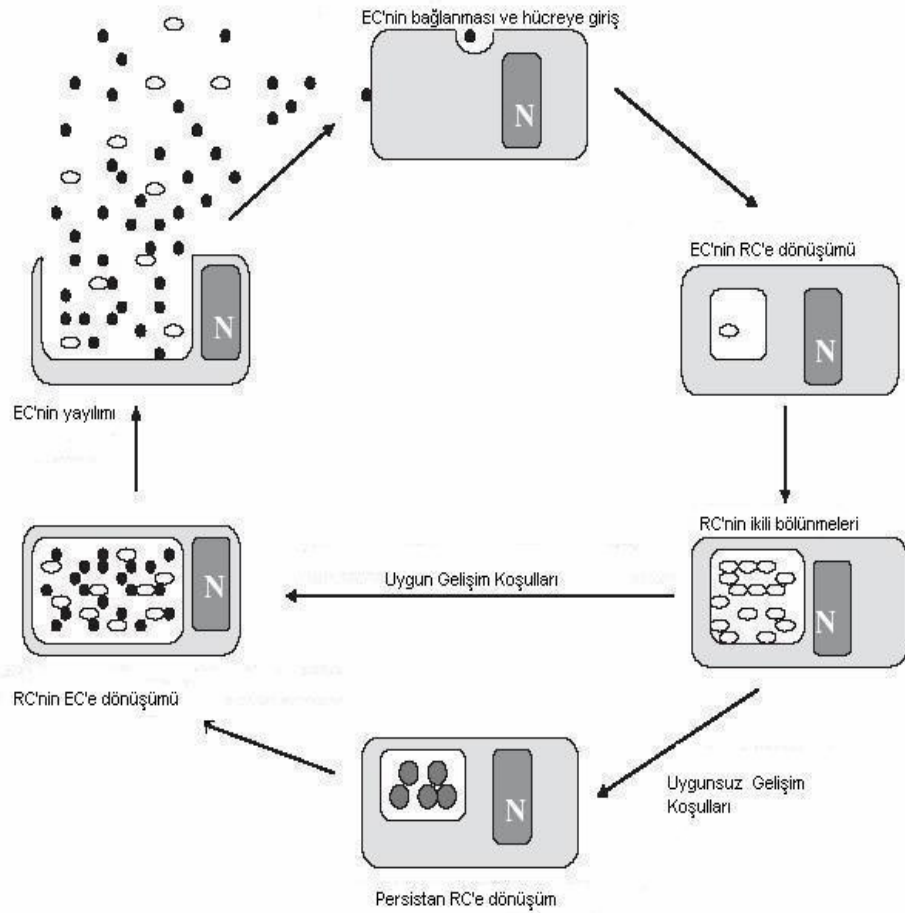
Klamidyalar diğer bakterilerden farklı olarak ATP oluşturmamaları nedeniyle zorunlu hücre içi parazitidirler. Bu özelliklerine bakılarak uzun yıllar virüsler arasında incelenen klamidyalar, gram negatif, hareketsiz, prokaryotik mikroorganizmalardır. Gram negatif bakteri benzeri iç ve dış hücre duvarı içerirler. Nükleik asit yapılarında hem DNA hem de RNA mevcuttur. Prokaryotik ribozom içeriklerine ilaveten kendi protein, nükleik asit ve lipidlerini sentezlerler (9).

Klamidyalar morfolojik olarak iki ayrı şekilde bulunurlar. İlk şekli 300 nm büyüklüğünde infeksiyöz "elementer cisim" (EC) dir. Hücre dışında replike olmaksızın canlılıklarını sürdürebilirler ve bakterinin bulaşmasından sorumludur. Elementer cisimler konak hücreyi infekte ettikten sonra 800–1000 nm büyüklüğündeki infeksiyöz olmayan, çoğalmaya hazır "retiküler cisim" (RC) lere dönüşürler. Retiküler cisimler hücre içinde bölünerek elementer cisimlere dönüşürler (2).

II.2. Yaşam Döngüsü

Klamidyal üreme döngüsü, elementer cismin infeksiyona duyarlı hücre yüzeyinde bilinmeyen hücresel reseptör veya reseptörlere bakteriyel ligantların bağlanması ile başlar. Hücreye girdikten sonra, elementer cisim endozom içine alınır (10). İnfeksiyondan birkaç saat sonra elementer cisim,

hücre duvar yapısında başlayan gevşeme ile retiküler cisime dönüşmeye başlar. İlk infeksiyondan yaklaşık 8–16 saat sonra erken protein transkripsiyonu ve ekspresyonu ile birlikte retiküler cisimlerin ikili bölünmeleri gerçekleşmeye başlar. 20–40 saat sonra bir kısım retiküler cisim, stoplazmasında yoğunlaşma oluşarak küçülür ve tipik elementer cisimlere dönüşür; diğer retiküler cisimler ise konak hücre sitoplazmasını dolduruncaya dek çoğalmayı sürdürerek, mikroskopta da tespit edilebilen klamidyal inklüzyon cisimlerini oluşturur (11,12). İnfeksiyöz elementer cisimler vakuolü parçalayarak hücre dışına yayılır ve diğer hücreleri infekte ederler. Bütün bu gelişme dönemleri 48–72 saat içinde tamamlanır (3). (Şekil 1)



Şekil 1- *C. trachomatis* Gelişim Döngüsü: N: nukleus; EC: elementer cisim; RC: retiküler cisim (13)

II. 3. Antijenik Yapı

Klamidyaların cins, tür ve tipe özgül antikorları vardır.

Lipopolisakkarit (LPS) cinse özgüdür. 2-keto-3-deoksi oktonik asit içeren, ısıya dayanıklı lipoprotein-karbonhidrat kompleksleridir (4). Salmonella RE suşları ve bazı enterobakterilerdeki ile aynı yapıyı içermektedir (9).

Klamidyal dış membranın 3 ana membran proteininden (OMP) oluşur. Mikroorganizmanın %60'ını oluşturan MOMP 40000 dalton moleküler ağırlığında ve porin özelliğine sahiptir. Cins, tür, alt tür ve serotip özgül determinantlar içermektedir (9). Sisteinden zengin proteinler arasındaki çapraz disülfid bağları ile klamidyal hücre duvarının sağlam yapısının korunmasında rol almaktadır (14). MOMP; *C. trachomatis*'in farklı serovarlarının sınıflandırılmasını sağlar. 4 sabit ve 5 değişken domen içerir. MOMP'u kodlayan *omp1* geni, insanda patojen olan *C. trachomatis*, *C. psittaci* ve *C. pneumoniae*'nin üçünde de bulunur ve genotiplendirmede yararlanılır (15). *Omp1*'deki geninin nükleotid sekansındaki varyasyonlar *C. trachomatis* serovarlarının antijenik farklılığını belirlemektedir. *C. trachomatis*'in aksine, *C. pneumoniae*'nin farklı serovarları tanımlanmamıştır (16).

OMP2, ikinci dış membran proteindir. 60000 dalton moleküler ağırlığındadır. Türe özgüdür ve diğer dış membran proteinlerine göre daha az antijenik farklılık göstermektedir

15000 moleküler ağırlığındaki üçüncü dış membran proteininin (OMP3) tür ve tipe özgül epitoplara içerdiği bilinmektedir (17).

Isı şok proteinleri (HSP), molekül ağırlıklarına göre 27, 70, 60, 90 kDa HSP olarak 4 gruba ayrılmışlardır. Özellikle HSP 60 ve HSP 70, patojen mikroorganizmaların major antijenleridir. Akut inflamatuvar cevapta ve çevresel koşullardan hücrenin korunmasında kritik rol oynarlar. İnfektif organizmalardan veya infekte olmuş hücrelerden salınan proteinler, sitokin salınımını etkileyerek bağışık yanıtı artırır. Daha önce *C. trachomatis* ile infekte olmuş, infertilite problemi olan birçok kadının mikrobiyal HSP'lere

karşı duyarlılık geliştirdiği ve uzun süreli asemptomatik bir infeksiyonun insanda da eksprese edilen mikrobiyal HSP epitoplarına karşı bağışıklığı tetiklediği bulunmuştur. Prokaryot ve memeli hücreleri arasındaki genetik homoloji, otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (18).

C. trachomatis elementer cisimlerinin ökaryotik hücrelere bağlanmasında görev alan özgül bağlayıcı proteinler bulunmaktadır. *C. trachomatis*'in trahom ve lenfogradüloza venerumdan sorumlu serovarları, 18000 ve 31000 dalton ağırlıklı proteinleri ile HeLa hücre zarına bağlanır. Bu proteinlere karşı oluşmuş antikorlar, elementer cisimlerin aktivitesini nötralize ederler (19,20).

II.4. Epidemiyoloji

II.4.1. Dünya ve Türkiye'de *C. trachomatis*'e Bağlı İnfeksiyonların Görülme Sıklığı

Vücuda vajen, serviks, üretra, rektum ve farenks gibi mukoza ile kaplı bölgelerden girerler. Her türlü korunmasız temas en önemli bulaş yoludur. Bunun yanı sıra gebelikte, doğum sırasında ya da sonrasında anneden bebeğe ve kan nakli yoluyla bulaşma olasıdır (21). A, B ve C serovarları trahomdan, D-K serovarları erişkin ve yenidoğan inklüzyon konjunktivitinden ve bazı ürogenital infeksiyonlardan sorumludur. L1–3 ise lenfogradüloza venerum ile ilişkilidir. *C. trachomatis* erkeklerde sıklıkla üretrit ve epididimit, kadınlarda ise servisit ve pelvik inflamatuvar hastalık oluşturmaktadır.

Klamidya infeksiyonlarının sıklığı 1987 ile 2002 yılları arasında 100,000 kişide 50,8'den 296,5'e yükselmiştir. Bu yüksek oran kadınlarda erkeklerden fazladır. En sık görüldüğü yaşlar kadınlarda 15–19, erkeklerde 20–24 yaşlar arasındadır. Çoğu zaman kadınlarda asemptomatik seyretmektedir. Dolayısıyla, tedavi uygulanamamakta ve epidemiyolojik olarak infeksiyon hastanın kendi cinsel eş ve/veya eşlerine, çocuklarına bulaşmaktadır (4). Klamidya infeksiyonlarını kontrol etmedeki başarısızlık ve insidanstaki artış çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar; (a) infeksiyonun non-spesifik semptomları, (b) infeksiyonun ılımlı semptomlara sahip olması veya asemptomatik olması,

(c) *C. trachomatis* tanısında yetersiz laboratuvar olanakları, (d) *C. trachomatis* tanı testlerinin pahalı ve teknoloji gerekiyor olması, (e) klinisyenin deneyim eksikliği; (f) en az 7 günlük tedavi gerektirmesi, (g) yüksek risk grubu ve partnerlerinin taranmasında kaynak yetersizliğidir (22). Genital *C. trachomatis* infeksiyonlarının yayılmasında sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü epidemiyolojik olarak önem taşır. Ayrıca infeksiyonun prevalansı ırklar arasında farklılık göstermekte, özellikle zenci ırkta daha fazla görülmektedir (4).

Dünya üzerinde her yıl 92 milyon yeni *C. trachomatis* infeksiyonu olduğu öngörülmektedir. Dünyadaki en sık görülen cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasındadır. Avrupa'da genç kadınlarda klamidyaya infeksiyon prevalansı %4,1–25, erkeklerde ise %1,3–12 arasında değişmektedir. İnfekte olmuş erkeklerin yarısından fazlasının ve infekte olmuş kadınların üçte ikisinin, 3 aydan fazla süredir klamidyaya infeksiyonu taşıyıcısı olduğu öngörülmektedir (23). Ülkemizde genital klamidyaya infeksiyonlarının durumu hakkında çalışmalar ortaya konulmaya başlanmıştır. İzmir bölgesinde yapılan çalışmalarda klamidyaya infeksiyonu insidansının asemptomatik kadınlarda %20–27,3, semptomatik kadınlarda %5,2–42, infertil kadınlarda %8,5–11,5, semptomatik gebe kadınlarda %8,8, genelev kadınlarında ise %25,4 olduğu bildirilmiştir (24, 25, 26, 27, 28, 29). İstanbul'da yapılan bazı çalışmalarda ise gebe kadınlarda %1,1, hayat kadınlarda %22, hayat kadınları ile ilişki kuran erkeklerde %14,7 oranında genital klamidyaya infeksiyonu saptanmıştır (30, 31, 32).

II.4.2. *Chlamydia Trachomatis* İle İlişkili Demografik Faktörler

Kadınlarda *C. trachomatis* ile en sıklıkla ilişkili olan faktör erken yaştır (< 20 yaş). Bunun temeli, hedef doku olan serviksteki skuamokolumnar bileşkenin bu dönemde dış servikal deliğe daha yakın olmasıdır (ektopi).

Daha ileri yaş grubundaki kadınlarda ise evli olmamak, nulliparite, siyah ırk ve düşük sosyoekonomik düzey riski artırmaktadır. Çok sayıda cinsel eş, yeni bir cinsel eş, bariyer kontraseptif yöntemlerin kullanılmaması ve gonokok

infeksiyonu varlığı klamidya infeksiyonu ile yakından ilişkilidir. Oral kontraseptif kullanımı servikal *C. trachomatis* ile ilişkili olsa da, PID ile ilişkili değildir, oral kontraseptif kullanımının ektoپیye yol açtığı öngörülmektedir (33).

II.5. Klinik

Trahom, *C. trachomatis*'in trahom biyovarı içinde yer alan A, B, Ba ve C serovarları etkindir. Konjunktiva ve korneanın körlüğe neden olabilen kronik bir infeksiyonudur. Erişkin inklüzyon konjunktiviti, genital infeksiyonlara neden olan *C. trachomatis* serovarları (B, Ba, D ve K) ile oluşur. Genital *C. trachomatis* infeksiyonu olan annelerden doğan bebeklerde, doğum kanalından bulaş sonucu yenidoğan inklüzyon konjunktiviti ve yenidoğan pnömonisi görülebilir (2).

Lenfogradüloz venereum, *C. trachomatis* biyovar lenfogradüloz venereum a ait L1, L2, L3 serovarları ile oluşur. Genital inokülasyonu takiben lenf ve kan dolaşımına geçer. En ayırıcı özelliği genital buboların oluşumudur. İnguinal ve femoral lenf nodları büyür, nekroz ve fistülizasyon görülebilir (9).

Erkeklerde en sık neden olduğu tablo non-gonokoksik üretritlerdir. Tedavi edilmediğinde artrit veya Reiter sendromuna neden olabilir. 35 yaş altındaki cinsel yönden aktif erkeklerde, *N. gonorrhoeae* ile birlikte epididimitin en sık nedenidir. Ayrıca, homoseksüel erkeklerde proktite neden olmaktadır.

Kadınlarda görülen çoğu infeksiyon asemptomatik seyretmektedir. Servisit, üretrit, endometrit, PID ve bartolin bezinde abse oluşturur. %50–60 oranında serviks ve üretra birlikte, %30 sadece serviks ve %5–30 oranında da sadece üretra tutulur. Vajinal akıntı, dizüri, kanama, alt abdominal ağrı görülebilir. Mukopürülan akıntı, kolayca veya kendiliğinden kanayabilen mukoza, kültür negatif piyüri ve sürüntü örneğinden yapılan gram boyamanın immersiyon yağı ile incelenmesinde her alanda 10'dan fazla polimorfonükleer lökosit (PNL) görülmesi *C. trachomatis*'i düşündürmelidir (33).

Pelvik inflamatuvar hastalığa sıklıkla *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* veya ikisi birlikte sebep olur. Özellikle *C. trachomatis* çok daha fazla saptanmaya başlanmıştır. Bir çalışmada; iki etkenin erkeklerde %20 ve kadınlarda % 42 oranında eş zamanlı saptanması nedeniyle, gonokok tanısı alan kadınlarda *C. trachomatis* enfeksiyonu ve sekel riski akla getirilerek tarama yapılması önerilmektedir (34).

Asemptomatik *C. trachomatis* enfeksiyonları infertilite ve ektopik gebeliğin önemli bir sebebidir. Bunun sebebi; belirgin semptomların olmamasına rağmen kronik ve fulminan seyirli olması ve sonuçta enfeksiyonun üst genital sisteme yayılarak salpenjite yol açmasıdır. İnfertil kadınların %30-%40'ında daha önce geçirdiği salpenjite bağlı tubal problem vardır (33). Seroepidemiyolojik çalışmalar ile asemptomatik olmalarına ve PID öyküleri olmamasına rağmen, tubal patolojiye sahip infertil kadınların serumlarında *C. trachomatis* antikoru saptanmıştır. Fallop tüpleri *C. trachomatis*'e duyarlıdır ve distal tüpte tıkanıklık infertiliteye, kısmi bir tıkanıklık ise ektopik gebeliğe yol açabilmektedir (35,36).

C. trachomatis enfeksiyonları, %30–40 erkek, %40–50 bayan infertilitesinden sorumludur. %10–15 oranında ise çiftlerde neden açıklanamamaktadır. Bayana ait nedenler; tübo-peritoneal, ovulatuvar ve uterin olabilir. Endokrin ve metabolik hastalıklar, enfeksiyon, endometriozis, yapısal anomaliler önemli infertilite sebepleridir. İnfertilite nedeni olarak *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* en sık enfeksiyöz sebepler olarak karşımıza çıkmaktadır (37).

II.6. Laboratuvar Tanı

C. trachomatis'in laboratuvar tanısında geleneksel yaklaşım ürogenital bölgeden toplanan ve hazırlanan örneklerin özel hücre kültürlerine inoküle edilerek üretilmesidir. 1980'li yıllardan itibaren çeşitli antijen ve nükleik asit saptama yöntemleri geliştirilmiş ve daha ucuz, hızlı, daha az tecrübe gerektiren ve transport koşullarından daha az etkilenen bu yöntemler kullanım alanı bulmuştur. Aslında *C. trachomatis* prevalansının çok daha

yüksek olduğu öngörülmektedir. *C. trachomatis*'in laboratuvar tanısına günümüz yaklaşımı kompleks ve tartışmalıdır. Yapılan taramalarda, farklı teknolojiye sahip test kombinasyonları ile tanı ve doğrulamaya gidilmesi yeni yaklaşımı oluşturmaktadır. Alınan örneğin kalitesi ve düşük prevalanslı topluluklarda uygulanan testlerin pozitif prediktif değeri sonucu etkileyen önemli faktörlerdir (33).

II.6.1. Örnek Toplanması Ve Taşınması

Tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü doğrudan alınan örneğin kalitesi ile ilişkilidir. *C. trachomatis* zorunlu hücre içi paraziti olduğu için, alınan örnek konak hücrelerini içermelidir. DFA testi ile örnek kalitesi değerlendirilebilir. Eğer örnek hücresel komponentler, kolumnar veya metaplastik hücreler içermiyorsa, sadece skuamöz epitel hücreleri veya PMN'ler içeriyorsa yetersiz olarak değerlendirilir (33).

Kadınlarda en sık eküvyon veya hücre fırçaları (cytobrush) ile endoserviksten örnek alınır. Hücre kültürlerine toksik etki gösterebilmeleri ve hücre kültüründe *C. trachomatis*'i inhibe edebilmeleri nedeniyle uygun eküvyonların kullanılması gerekir. *C. trachomatis* hücre kültürü için örnek almada Dakron eküvyon kullanılır. Ağaç saplı eküvyonları kullanmaktan kaçınılmalıdır (9,38).

Endoservikal bölgeden örnek alınmadan önce servikal girişin dış kısmında bulunan akıntı ve sekresyonlar steril bir eküvyon veya gazlı bezle temizlenir. Bunun nedeni bakteriyel kontaminasyonun ve hücre kültürüne olası toksik etkilerin engellenmesidir. Servikal girişten 1-2 cm içeriye eküvyon sokularak skuamokolumnar bileşke geçilir, 360 derece döndürülerek ve mümkün olduğu kadar epitel hücresi toplamaya çalışılarak örnek alınır. Vajinal mukozaya değmemeye özen gösterilerek eküvyon geri çekilir. Hücre fırçaları daha fazla hücre toplayabilmekte, dolayısıyla hücre kültürü ve DFA ile saptama olasılığı artmaktadır. Ancak, hücre fırçaları ile örnek alımı sırasında kanama olabileceği için, kanın inhibitör etki yaptığı non-kültürel testlerde avantajlı değildir.

Servikal sürüntülerle birlikte, üretral sürüntü örneklerinin de aynı anda alınmasının, kültür duyarlılığının %23 oranında artırdığı bildirilmiştir (39). Üretral örnek alımında, eküvyon üretra ağzından 1 cm içeri sokularak döndürülür ve servikal örnekle birlikte veya ayrı ayrı taşıma besiyerine konulur. Erkeklerde distal üretradan örnek alınır. Kuru bir eküvyon üretradan içeri 3–4 cm sokularak döndürülür ve hemen taşıma besiyerine konulur. Üretral sürüntü alınmadan önceki en az bir saatlik süre içinde, infekte kolumnar hücreleri uzaklaştırarak tanı testlerinin çoğunun duyarlılığının azalmasına yol açacağı için hasta idrar yapmamalıdır.

Konjunktival örnek alımında da pürülan eksuda uzaklaştırılarak palpebral konjunktivadan örnek toplanır. Lenfoganüloma venereum şüphesi olan hastalarda, bubolardan yapılan aspiratlar, alt gastrointestinal sistemden anoskopi yardımıyla alınan rektal sürüntü veya biyopsiler en iyi örneklerdir. Gastrointestinal sistemden örnek için en uygun bölgeler hipertrofik veya ülser lezyonlardır.

Alınan örnekler hemen taşıma besiyerine alınmalı ve laboratuvara taşınincaya kadar 2–8°C'de saklanmalıdır. Örnekler, en geç 48 saat içinde kültüre alınmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, taşıma ortamı içindeki örnekler -70°C'de dondurularak saklanır, ancak bu örneklerdeki elementer cisimlerde %20 oranında canlılık kaybı ile sonuçlanmaktadır.

En çok kullanılan taşıma besiyerleri 2-sükroz fosfat (2-SP) veya sükroz glutamat fosfattır. Dondurulmak üzere saklanan taşıma besiyerlerine %2–5 oranında fetal calf serum (FCS) eklenmesinin klamidyaların canlılığının korunmasına yardımcı olacağı bildirilmiştir. Taşıma ortamlarına bakteriyel ve fungal kontaminantların üremesini engellemek için gerekli antimikrobiyal ve antifungal ajanlar eklenmelidir. Bu ajanlara klamidyaların duyarlı olmamasına dikkat edilmelidir. Bu nedenle geniş spektrumlu antibiyotikler olan tetrasiklin, penisilin veya makrolidler kullanılmamalıdır. Sıklıkla kullanılan viral taşıma besiyerleri penisilin içerdiği için uygun değildir. Genellikle bakteriyel kontaminasyonu engellemek için gentamisin (10µg/ml) veya vankomisin (100µg/ml), fungal kontaminasyonu engellemek için de amfoterisin B (2,5–4,0µg/ml) veya nistatin (25–50 U/ml) kullanılır. Son dönemlerde kültür ve

kültür dışı testlerde kullanılmak üzere hazır sentetik taşıma ortamları geliştirilmiştir [M4 transport media (MicroTest, Inc.), FlexTrans media (Bartels Diagnostics)].

Kültür dışı testler için uygun örnek alımı ve kullanılacak taşıma besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda seçilir ve genellikle kültür için açıklanan şekilde alınır. *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* birlikte saptandığı testlerde tek bir endoservikal veya üretral örnek yeterli olmaktadır. Genellikle vajinal, rektal ve nazofaringeal örnekler kültür dışı testler için uygun değildir. Hedef DNA kopyaları idrarda da bulunmaktadır ve nükleik asit amplifikasyon testleri ile saptanabilir. İdrarın incelenmesi, asemptomatik popülasyonların noninvaziv olarak taranmasına olanak sağlamaktadır. Ancak, ilk idrar olması, uygun miktarda olması veya ilk idrardan en az 1–2 saat sonra alınması gerekmektedir (33).

II.6.2. Kültür Yöntemi

Hücre kültürü yakın zamana kadar ürogenital örneklerde *C. trachomatis*'in aranmasında %100'e yaklaşan özgüllüğü nedeniyle altın standart olarak benimsenmiştir. Sadece canlı infeksiyöz elementer cisimleri gösterir ve kontaminasyon riski minimaldir. Altın standart olarak kullanımındaki sorunlar; örnek transportunda kesinlikle soğuk zincire uyulması ve 3–7 günde sonuç vermesidir. En önemli avantajı ise; organizmayı canlı koruyarak genotiplendirme ve antibiyotik duyarlılık testleri gibi çalışmalara olanak sağlamasıdır. *C. trachomatis* tanısında servikal, üretral, nazofaringeal, rektal ve puberte öncesi çağıdaki kızlarda vajinal örneklerde hücre kültürü uygulanabilir.

C. trachomatis kültürü, örnekler hücre serilerine inoküle edilerek uygulanmaktadır. Eğer yeterli sayıda canlı elementer cisim varsa, hücreleri infekte ederek inklüzyon cisimlerini oluşturur. Gerekli hücre serileri, genellikle "shell vial" yöntemi ile tabanında oturmuş uygun lameller bulunan şişeciklerde veya çok çukurlu mikrokültür plaklarında üretilir. Sıklıkla, McCoy, HeLa 229 veya Buffalo yeşil maymun böbrek hücresi (BGMK) hücreleri

kullanılır. McCoy hücreleri ve sikloheksimid içeren hücre üretme ortamı kullanılarak shell vial yöntemi ile yapılan kültürlerin, mikropalak yöntemine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Mikropalak yönteminde çukurdan çukura geçişteki kontaminasyon riski yüksektir. İnokülasyondan önce örnekler vortekslenerek konak hücrelerin parçalanması ve elementer cisimlerin serbestleştirilmesi sağlanmalıdır. Shell vial yönteminde, hücre serisine örnek eklendikten sonra santrifüj işlemi ile elementer cisimlerin hücrelere geçmesi sağlanır. Mikropalak yönteminde daha düşük devirlerde santrifüj yapılabilmesi bir dezavantajdır. Santrifüjden sonra hücre serilerinin üstünde kalan kısmın aspirasyonla uzaklaştırılarak taze hücre kültürü üretme ortamı eklenmesi sitotoksik etkileri en aza indirir.

İnokülasyondan 48–72 saat sonra oluşan inklüzyonlar, tüm klamidyal türlerde saptanabilen klamidyal LPS'e veya *C. trachomatis*'e özgül MOMP'a tutunan flöresan boya ile işaretli antikorlarla boyanarak görüntülenirler. İnküzyonların görüntülenmesi, morfolojik bakımdan çok tipik olmaları nedeni ile kültür testlerinin %100 özgül olmasını sağlamaktadır. İncelenen örnekte bir veya daha fazla inklüzyon cisminin görülmesi kültür pozitif olarak değerlendirilir.

Gram, Giemsa ve iyodin gibi boyalar, flöresan antikor ile boyama tekniğine göre düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip oldukları için tercih edilmemektedir. Klamidyalar gram olumsuz olarak nitelendirilse de, değişken boyanmaları nedeniyle Gram boyama pratik değildir. Giemsa ile boyamada, diğer mikroorganizmalardan renk, morfoloji, inklüzyonun hücre içindeki lokalizasyonuna bağlı olarak ayırt edilmesi mümkün olsa da, deneyimli bir göz gerektirmesi ve boyamadan kaynaklanan kalıntılarla sıklıkla karışabilmesi nedeniyle kullanışlı değildir. İyodin glikojene özgü bir boyadır. Ancak, *C. trachomatis*'in gelişme döngüsünde sadece belli fazlarda glikojen içermesi nedeniyle duyarlılığı düşüktür. En önemlisi de, servikal hücrelerin glikojen içermesi nedeniyle endoservikal örneklerin değerlendirilmesinde kullanılması önerilmemektedir (40, 41, 42, 43, 44).

II.6.3. Antijen Aranması

DFA tekniği; servikal, üretral, rektal, konjunktival ve infantların solunum örneklerinden hazırlanan preparatların florosein izotiyosiyanat ile işaretleilmiş *C. trachomatis* monoklonal antikoları ile karşılaştırılarak örnekteki elementer cisimlerin görüntülenmesine dayanmaktadır. Hızlı bir testtir, 30 dakikada sonuç alınabilir. Örnek taşınması sırasında soğuk zincir kurallarına uyulması gerekmez (9). Tanıda en çok anti-MOMP monoklonal antikoları kullanılmaktadır. Pozitif sonuç için genel olarak kabul edilen ölçüt, incelenen preparatta en az 10 elementer cisim bulunmasıdır. Ancak bu sınır değeri kullanılan kite ve/veya incelemeyi yapan kişinin tecrübesine göre daha düşük sayıda olabilir (45).

Enzim immün assay (EIA) yöntemi; klamidyal LPS antijenlerini saptamaya yöneliktir. Klamidyal LPS, MOMP antijenine göre bol miktarda ve daha çözünür olduğundan tercih edilmektedir. Genellikle sandviç EIA prensibi uygulanmaktadır. Klinik örneklerin oda sıcaklığında taşınabilmesi, 4 saat gibi bir sürede sonuç vermesi ve aynı anda çok sayıda örneğin incelenebilmesi avantajlarıdır. Anti-LPS antikoların diğer klamidyal türlerine ve bazı klamidyal dışı bakterilere ait LPS yapılarıyla reaksiyon vermesine bağlı yalancı pozitiflikler gözlenebilir (45).

C. trachomatis antijenlerini saptayan çok sayıda hızlı test (point of care tests) geliştirilmiştir. Prensip olarak EIA temeline dayanmakta olup klinik örnekte klamidyal LPS antijeninin aranmasına yöneliktir. Genellikle klinisyen tarafından hasta başı testler olarak kullanılan, komplike ekipmana gereksinim göstermeyen, nispeten ucuz ve 30 dakika gibi kısa sürelerde sonuç alınabilen testlerdir. Sonuçlar gözle kalitatif olarak değerlendirilir. Çapraz reaksiyon nedeniyle oluşan yalancı pozitiflikler hızlı testlerin düşük riskli ve semptomsuz hasta gruplarında tarama amaçlı kullanımını kısıtlamaktadır. Tanıda, laboratuvar dışı ön testler olarak değerlendirilmeli, pozitif sonuçlar doğrulanmalıdır (33).

Optik immuno assay (OIA) yöntemi ile ince bir film yüzeyinde oluşan antijen antikor etkileşimi antikoru tanıyan konjugat aracılığı ile gözle görülebilir hale getirilmektedir (46).

II.6.4. Seroloji

Kompleman birleşme deneyi; klamidyal antikorların gösterildiği ilk serolojik yöntemdir. Kullanılan antijen embryonlu yumurtanın sarı kesesinde üretilmektedir. LGV ve psittakoz tanısında kullanılmakla birlikte, oküler ve servikal infeksiyonlarda duyarlı değildir (9).

İndirek mikroimmunoflöresan (MIF) yönteminde; formalinize edilmiş elementer cisimler antijen olarak kullanılır. IgM, IgG ve IgA antikorları ölçülebilir. Teknik olarak oldukça zordur ve testin yorumlanması subjektiftir. Epidemiyolojik çalışmalarda, özellikle populasyondaki klamidya ile karşılaşma oranının saptanmasını amaçlayan genel taramalarda kullanışlıdır (9, 45).

EIA yönteminde; cinse özgü elementer veya retiküler cisimlere ait LPS kullanılarak klamidyalara karşı antikorlar tespit edilir. Dolayısıyla diğer klamidya türleri ile çapraz reaksiyonlar görülebilir. Yüksek riskli toplumların incelenmesinde veya infantlarda IgM'in saptanmasında kullanılabilir (33).

II.6.5. Moleküler Yöntemler

C. trachomatis'in tanısında kullanılan moleküler testler iki grupta toplanır: Hibridizasyon ve amplifikasyon temelli testler

Hibridizasyon testleri, genel olarak 3 çeşittir; katı faz DNA hibridizasyon testi, sıvı faz DNA hibridizasyon testi ve in situ hibridizasyon testi. Katı fazda, hibridizasyon membranda gerçekleşirken, sıvı fazda hibridizasyon sıvı ortamda gerçekleşmektedir. Katı faz hibridizasyonunun bir varyasyonu olan sandviç (capture) hibridizasyonda iki prob kullanılmaktadır; birisi örnekteki hedef nükleik asiti yakalarken, diğeri ise tespit yapmaktadır. İn situ

hibridizasyonda ise enfekte dokulardaki hedef nükleik asit, katı ve sıvı fazdaki prensiplerle tespit edilmektedir.

C. trachomatis tanısında en yaygın kullanılan nükleik asit hibridizasyon testi, PACE 2'dir (Genprobe, San Diego, USA). PACE 2 'de tek zincirli DNA probu kullanılarak *C. trachomatis* ribozomal RNA'sı tespit edilir. Prob, bir akrinyum ester ile işaretli olup, DNA-RNA hibrid varlığı kemiluminometre ile ölçülür. *C. trachomatis* birlikte *N. gonorrhoeae* değerlendirilebilir, transportta soğuk zincire gerek yoktur ve 2–3 saat gibi bir sürede sonuç alınabilir. Özellikle düşük prevalanslı toplumlarda probe competition assay (PCA) ile doğrulanması gereklidir (33).

Amplifikasyon testleri: Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, hızlı ancak pahalı testlerdir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); DNA'nın primer ve enzimler yardımıyla arttırılarak saptanabilir hale getirilmesi temeline dayanmaktadır. Cins, tür, grup veya suşa spesifik olabilir. Reaksiyon inhibitörleri, kontaminasyon ve nonspesifik reaksiyonlar göz önünde bulundurulmalıdır (33). Ligaz zincir reaksiyonu (LCR); DNA çoğaltılması amacıyla geliştirilmiş bir prob hibridizasyon-ligasyon yöntemidir. Primerlerden amplikonlar üretmek yerine, problemlerin amplifikasyonunu sağlar. Transcription mediated amplification (TMA); transkripsiyon aracılı RNA amplifikasyon yöntemidir. Sistem, RNA polimeraz ve reverz transkriptaz enzimleri yardımı ile RNA çoğaltılması esasına dayanır. NAAT'lerde pozitif sonuç için, hedef organizmanın bütünlüğünün bozulmamış olması veya canlı olması şartı yoktur. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılamaması bir dezavantajdır. Özellikle PCR, duyarlılığın yüksekliği ile klamidyada tanısında altın standart olmaya adaydır (15).

II.7. Tedavi

Tetrasiklinler, *C. trachomatis* infeksiyonlarında genellikle birinci seçenek olan antibiyotiklerdir. Doksisisiklin ve azitromisin de önerilmektedir. Azitromisinin en önemli özelliği, tek doz olarak kullanılabilmesi ve infeksiyonun yaygın olduğu olgularda bile tam iyileşmeyi sağlayabilmesidir.

Tetrasiklinlerin kontrendike olduğu hamile kadınlar, infantlar, küçük çocuklar gibi olgularda eritromisin önerilmektedir (47). Komplike olmamış genital *C. trachomatis* infeksiyonlarında 7 gün süreyle oral yol ile günde iki kez 100mg doksisisiklin veya 1 g azitromisin önerilmektedir (48, 49).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1. Olgu Seçimi Ve Örnek Alınması

a. Olgu Seçimi:

Örnekler, Kasım 2005-Eylül 2006 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran hastalardan alındı.

Servisitle ilgili yakınması olmayan toplam 100 infertil hastadan örnek alındı. Çalışmaya alınan hastaların yaşları 23–48 arasında (ortalama 34,15, median 33,0) idi. Her hasta için; hastanın yaşı sistemik hastalıkları, infertilite sebebi, PID öyküsü, antibiyotik kullanımı, diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar öyküsü ve servikal erozyon gibi bilgiler içeren hasta formları dolduruldu (Ek 1).

b. Örnek Alımı:

Her hastadan, hücre kültürü, DFA ve hibridizasyon testi için ayrı endoservikal sürüntü örneği alındı. Örnek alımında, servikal bölgedeki mukus ve/veya kan bir eküvyon ile temizlendi. Servikste geçiş zonundan, endoüretra meatusundan 2–4 cm içeriye sokulan eküvyon 10–30 sn. 360 derece döndürülerek örnek alındı. Sürüntü örneklerinin alınmasında mümkün olduğu kadar çok epitel hücrelerinin toplanmasına, mukus içermemesine ve eküvyonun vajen mukozasına değmemesine dikkat edildi. Hücre kültürü ve

DFA için kullanılacak olan örnek, hazır taşıyıcı besiyeri olarak kullanılan Chlamydia transport medium içeren tüplere (Eurotubo®, Deltalab, İspanya) aktarıldı. Hibridizasyon testi için alınan örnek ticari Gen-Probe örnek taşıma tüpüne konarak kapağı kapatıldı. Eküvyonun ucu tüpün bittiği yerden kırılarak kapağı kapatıldı. Örnekler laboratuvara ulaşınca kadar +4°C'de saklandı. Bütün örnekler işlemleninceye kadar -70°C'ye kaldırıldı.

III. 2. Hücre Kültürü İle *C. Trachomatis* Aranması

Hücre kültürü çalışmalarında, bir sürekli hücre serisi olan McCoy hücreleri kullanıldı. Hücreler flasklarda ardışık pasajlarla üretilerek, "shell vial" yöntemi olarak adlandırılan, içinde tabana oturan 12 mm çaplı yuvarlak lamellerin bulunduğu, 15 mm çapında, 5 cm boyunda şişelere aktarıldı. Klinik örneklerin inokülasyonu şişelerin içinde gerçekleştirildi. *C. trachomatis*'e özgül FITC ile işaretlenmiş MOMP'a karşı monoklonal antikorlar ile boyanarak immunofloresan mikroskopunda değerlendirildi.

III. 2. 1. Araç, Gereç Ve Ortamlar:

- Kullanılan sıvıların ve solüsyonların formülleri:

Klamidyal taşıma ortamı : 2-SP (0,2 M sükröz, 0,02 M fosfat)

68,46 g Sukroz

2,01 g K₂HPO₄

1,01 g KH₂PO₄

100 ml FCS (Biochrom AG/L1815, Berlin, Almanya)

10 µg/ml Gentamisin(Biochrom AG/A2712, Berlin, Almanya)

100 µg/ml Vankomisin(Biochrom AG, Berlin, Almanya)

4 µg/ml Amfoterisin B(Biochrom AG/A2612, Berlin, Almanya)

1 litre Distile su

McCoy hücreleri üretme ortamı (Growth medium- GM):

- 1 L Minimum Essential Medium (MEM) (Biochrom AG/F0315, Berlin, Almanya)
- 10 ml FCS (inaktive) (Biochrom AG/L1815, Berlin, Almanya)
- 2 ml 200 mM L-glutamin (Biochrom AG/K0282, Berlin, Almanya)
- 1 ml 1 M HEPES (Biochrom AG/L1613, Berlin, Almanya)
- 5 ml Glukoz % 8,8 (Applichem, Darmstadt, Almanya)
- 1 ml Penisilin-streptomisin solüsyon (Biochrom AG/A2213, Berlin, Almanya)
- 0,1 ml Gentamisin solüsyonu (10 mg/ml) (Biochrom AG/A2712, Berlin, Almanya)

Tüm solüsyonlar steril olarak kullanıldı. FCS, 56°C'de 10 dakikada su banyosunda inaktive edildi. Glukoz endotoksin içermeyen distile su içinde çözdürülerek, 0,22 µm filtreden geçirilip sterilize edildi. Ortam +4°C 'de 50'şer ml olarak steril vidalı kapaklı polistiren tüplerde saklandı.

McCoy hücre dizisini idame ettirme- idame sıvısı (Maintenance Medium- MM):

- 100 ml MEM (Biochrom AG/F0315, Berlin, Almanya)
- 2 ml FCS (inaktive) (Biochrom AG/L1815, Berlin, Almanya)
- 2 ml 200 mM L-glutamin (Biochrom AG/K0282, Berlin, Almanya)
- 1 ml 1 M HEPES (Biochrom AG/L1613, Berlin, Almanya)
- 1 ml Penisilin/streptomisin solüsyonu (Biochrom AG/A2213, Berlin, Almanya)
- 0,1 ml 10 mg/ml Gentamisin (Biochrom AG/A2712, Berlin, Almanya)
- 2 ml 0,25 mg/ml Amfoterisin B solüsyonu (Biochrom AG/A2612, Berlin, Almanya)
- 5,5 ml % 8,8 Glukoz (Applichem, Darmstadt, Almanya)
- 0,4 ml Sikloheksimid

Klamidyal izolasyon sıvısı :

- 100 ml Eagle's MEM (Biochrom AG/F0315, Berlin, Almanya)
- 2 ml FCS (inaktive) (Biochrom AG/L1815, Berlin, Almanya)
- 2 ml L-glutamin (Biochrom AG/K0282, Berlin, Almanya)
- 1 ml HEPES (Biochrom AG/L1613, Berlin, Almanya)
- 0,4 ml 200 µg/ml Siklohekzimid stok solüsyon
(Stok solüsyon: 10 mg siklohekzimid, 50 ml steril distile su)
- 5 ml % 8,8 Glukoz (Applichem, Darmstadt, Almanya)
- 1 ml Penisilin/streptomisin solüsyonu (Biochrom AG/A2213, Berlin, Almanya)
- 0,1 ml Gentamisin (Biochrom AG/A2712, Berlin, Almanya)
- 1,6 ml Amfoterisin B solüsyonu (Biochrom AG/A2612, Berlin, Almanya)

Tüm solüsyonlar aseptik koşullara uyularak hazırlandı. 50'şer ml olarak steril vidalı kapaklı polistiren tüplerde +4°C 'de olarak saklandı.

- Shell vial tüpleri(Borkim, İstanbul, Türkiye)
- Tripsin EDTA (Biochrom AG/L2143, Berlin, Almanya)
- Aseton HPLC (Applichem/A1567, Darmstadt, Almanya)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (Biochrom AG/L2013, Berlin, Almanya)
- 25 cm²'lik hücre kültürü flaskları (polistiren) (Greiner Bio-One/690160, Monroe, North Carolina)
- Steril pipetler(Greiner Bio-One, Monroe, North Carolina)
- 15 ml'lik falcon tüpler(Greiner Bio-One/188271, Monroe, North Carolina)
- Monoklonal antikor
- Rodajlı lam(Borkim, İstanbul, Türkiye)
- Lamel (Borkim, İstanbul, Türkiye)
- 0,22 enjektör filtre (MN, Düren, Almanya)
- 0,45 enjektör filtre(MN, Düren, Almanya)
- Laminar akımlı kabinet
- CO₂'li 37°C'lik etüv

- Santrifüj
- İverted ışık mikroskobu
- Flöresan mikroskobu
- -70°C Derin dondurucu

III. 2. 2. Hücre Kültürü Uygulaması:

Mccoy Hücrelerinin Seri Pasajlanması, Saklanması Ve Shell Vial Tüplerine Aktarılması;

1. McCoy hücrelerinin tabanında tam bir tabaka oluşturduğu flask alındı. İverted ışık mikroskobunda hücrelerin sağlıklı olup olmadığı kontrol edildi. Hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı.
2. Tabandaki hücreler, pH'ı 7,2 olan PBS ile çalkalanarak yıkandı (25 cm² flask için 2,5 ml PBS veya HBSS) ve PBS aspire edilerek atıldı.
3. 37°C'ye getirilmiş 1,25 ml tripsin (25 cm² flask için) hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde flaska konuldu ve 5–10 dakika 37°C'de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda flask etüvden çıkarıldı ve yandan birkaç kez hafifçe vurularak tabandan hücrelerin ayrılması sağlandı.
4. Üzerine tripsinin 4 katı (5ml) GM konarak; tripsinin hücreleri yıkıcı etkisi nötralize edildi. Flaskın içindeki hücreler steril pipet yardımıyla birkaç kez çekilip bırakılarak hücrelerin birbirinde ayrılmaları sağlandı. Ardından pipetle falcon tüpe aktarıldı. 1000rpm' (100xg) de 5 dakika santrifüjlendi.
5. Üst sıvı atıldı ve geride kalan pelet 2 ml GM ile resüspanse edildi.
6. Boş bir flask içine (25 cm²) 4 ml GM kondu ve 3 ml resüspanse pelet eklendi.
7. %5 CO₂'li etüvde 37°C'de tam tabaka olana kadar inkübe edildi.
8. Shell-vial tüpleri içine yuvarlak lameller yerleştirildikten sonra 121 °C'de 20 dak. sterilize edildi. Kapaklar ayrıca sterilize edildikten sonra, tüplerin kapakları kapatıldı.

9. Shell vial tüplerine yaklaşık 1,5–2 ml olacak miktarda GM konu. 0,5–1 ml hücre içeren ortam aktarıldı. %5 CO₂'li etüvde 37°C'da 24–48 saat inkübe edildi.

10. Mikroskopta hücrelerin tek tabaka üreyip, örnek ekimine hazır olup olmadığı kontrol edildi.

Örneğin Hazırlanması:

Poliklinikte alınan endoservikal sürüntü örnekleri bekletmeden taşıyıcı besiyeri içine alınarak +4°C'de saklandı ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırıldı. İşleme hemen alınmayacak örnekler -70°C'ye kaldırıldı. Örneklerin üzerine 1,5–2 ml GM konarak vortekslenerek hücrelerin parçalanması sağlandı, böylelikle ortamda olası serbest elementer cisimlerin artması sağlandı. Sonra eküvyon döndürülerek sıkılıp atıldı. Hücre kültürlerine ekim 0,45 mikron por çaplı filtreden geçirilerek yapıldı.

İnokülasyon:

1. Etüve kaldırılmış shell vial tüpleri inverted ışık mikroskopunda hücrelerin inokülasyona uygun olup olmadığı kontrol edildikten sonra, her örnek için 2 shell vial tüpü hazırlandı.

2. Shell vial tüpü içindeki GM aspire edilerek uzaklaştırıldı.

3. Vorteksle karıştırılmış GM içindeki örnekten her shell vial tüpü içine 0,2 ml aktarıldı. Örnek bulanık veya mukus içeriyorsa filtreden geçirilerek ekim yapıldı.

4. Shell vial tüpleri kapakları kapatılarak 25-30°C'de 1750xg'de 60 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Böylece varlığı olası elementer cisimlerin hücrelerin yüzeyine gömülmeleri sağlandı.

5. Shell vial tüplerinin içindeki ortam aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine, 1,5 ml klamidya MM besiyeri (sikloheksimid içeren, glukozlu) eklendi.

6. Shell vial tüpleri 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edildi.

Monoklonal Antikor İle Boyama:

1. İnkübasyon sonunda shell vial tüpleri önce inverted ışık mikroskopunda incelenerek kontaminasyon ve toksisite bakımından sağlıklı olup olmadıkları incelendi.
2. Shell vial tüpleri içinden besiyeri alındı. Hücreler iki kez 1–2 ml PBS ile yıkandı ve 5 dakika PBS içinde bekletildi.
3. PBS uzaklaştırıldı ve 2 ml soğuk aseton eklendi (fiksasyon işlemi). 10 dak -20 °C'de bekletildi.
4. Aseton tüplerden aspire edilerek uzaklaştırıldı.
5. Lam üzerine 25 µl FITC ile işaretlenmiş *C. trachomatis*'ın MOMP antijenine özgül monoklonal antikor damlatıldı ve yuvarlak lameller kurutma kâğıdı üzerinde kurutularak hücreli yüzeyleri monoklonal üzerine kapatıldı.
6. 37°C'de nemli ve karanlık ortamda 30 dak. inkübe edildi.
7. Lameller PBS ile yıkandı. Temiz lamların üzerine bir damla "fluokeep" kondu.
8. Lamellerin hücreli yüzü aşağıya gelecek şekilde lam üzerine kapatıldı.
9. Flöresan mikroskopta x400 büyütmede incelendi.
10. Sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri parlak elma yeşili şeklinde görüldü.

Hücre kültüründe bir veya daha fazla inklüzyon cisimciği içeren örnekler pozitif olarak kabul edildi.

III. 3. DFA İle Antijen Aranması:

DFA tekniği için; *C. trachomatis*'ın MOMP antijenine özgül olan FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikorlar içeren ticari kit Fluorotect® Chlamydia (Omega Diagnostics) kullanıldı. Testin her yapılışında pozitif ve negatif kontroller eş zamanlı olarak kullanıldı. İşlemler üretici firmanın önerilerine uygun olarak yapıldı.

III. 3. 1. Kit İçeriği:

FITC ile işaretli liyofilize monoklonal antikor
Kaplama sıvısı
Pozitif kontrol

III. 3. 2. Araç Ve Gereçler:

Otomatik pipetler
Lamlar
Lameller
Cam şale
Sitospin cihazı
Flöresan mikroskobu

III. 3. 3. Testin Yapılışı:

1. Örnekler vortekslendi.
2. Ependorflara 300 µl örnek konarak kısa süreli santrifüjlendi.
3. Örneğin üst kısmından 200 µl atıldı.
4. Kalan 100 µl bir iki kez karıştırıldı ve sitospinlendi.
5. Lam kurutulduktan sonra aseton konulan cam şalelerde -20°C'de 10 dak. bekletilerek fikse edildi.
6. 25 µl monoklonal antikor ile boyandı.
7. Lamlar nemli ortam sağlamak üzere içinde ıslatılmış kâğıt havlu bulunan lam saklama kutularında 30 dak. karanlıkta 37°C'de bekletildi.
8. İnkübasyon sonunda lamlar içinde PBS bulunan şalede yıkanarak bağlanmayan antikorlar lamlardan uzaklaştırıldı ve lamlar kurumaya bırakıldı.
9. Hazırlanan preparatların üzerine bir damla kaplama sıvısı konarak lamel ile kapatıldı. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi.
10. Hazırlanan preparatlar 400x büyütmede flöresan mikroskopu ile incelendi.

Flöresan mikroskopunda inklüzyon cisimcikleri arandı ve üç veya daha fazla elma yeşili flöresan veren düzgün kenarlı yuvarlak veya oval elementer cisim içeren örnekler pozitif kabul edildi. İncelenmeye değer olabilmesi için, her sürüntü örneğinin en az 25 kolumnar epitel hücresi içermesi şartı göz önünde bulunduruldu.

III. 4. *Chlamydia Trachomatis/Neisseria Gonorrhoea* Hibridizasyon Testi (PACE 2C CT/NG) İle Antijen Aranması

PACE 2C her iki etkeni aynı anda ve tek örnekten test edebilen bir hibridizasyon testidir. PACE 2C, nükleik asit hibridizasyon teknolojisini kullanarak endoservikal ve üretral örneklerden *C. trachomatis* ve/veya *N. gonorrhoea*'yı saptayabilen bir DNA probe testidir. Hedef organizmanın ribozomal RNA'sına komplementer olan kemiluminesan madde ile işaretlenmiş tek sarmallı DNA probu kullanılır. Ribozomal RNA hedef organizmadan açığa çıktıktan sonra işaretlenmiş DNA probe ile hedef organizma rRNA'sı sabit DNA: RNA hibridi oluşturur. Luminometre ile DNA: RNA hibrid ışınması ölçülür. Test sonuçları, örnek ile negatif referansların ortalaması arasındaki fark hesaplanarak bulunur. Test süresi yaklaşık 1,5–2 saattir.

III. 4. 1. Kit İçeriği

PACE 2 hybridization buffer; %20 deterjan içerir

PACE 2C CT/NG probe reagent; Liyofilize, işaretli, infeksiyöz olmayan DNA probe (<500 ng/vial)

PACE 2C Seçici çözelti %8 deterjan içerir

PACE 2 STD Ayırıştırma çözeltisi

PACE 2 STD negatif referans

PACE 2 *Chlamydia trachomatis* pozitif kontrol

PACE 2 *Neisseria gonorrhoeae* pozitif kontrol

PACE 2 STD yıkama solüsyonu

Koruyucu kartlar
Saptama reajeni I
Saptama reajeni II

III. 4. 2. Araç Ve Gereçler

Su banyosu
Otomatik pipet
Magnetik rak
Gen Probe Leader 450 (Okuyucu)

III. 4. 3. Testin Yapılışı

Test, önerildiği gibi endoservikal örneklerde kullanıldı. Reajenler temiz bir ortamda hazırlandı. Her aşamada eldiven ve otomatik pipetler kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan ayrıştırma çözeltisi sodyum azid içerdiği için toksik olduğundan ciltle temas etmemesine dikkat edildi. Aynı şekilde, saptama reajeni I ve II de son derece toksik ve koroziv olduğu için deri ve mukozalarla temas etmemesine dikkat edildi.

1. Örneklerin hazırlanması

- a. Çalışmadan önce tüm örnekler oda ısısına getirildi.
- b. 5 sn. vortekslendiler.
- c. Eküvyon tüp kenarında sıkılarak atıldı.
- d. 5 sn. daha vortekslendiler.

2. Reajenlerin hazırlanması

- a. Kullanmadan önce prob ve ayrıştırma çözeltisi hariç tüm reajenler oda ısısına getirildi. Prob ve ayrıştırma çözeltisi kullanıncaya kadar 2–8°C'de tutuldu.

- b. "Probe reagent": Liyofilize probe; "PACE 2C hibridizasyon buffer" oda ısısına getirildikten sonra 10 sn vortekslendi. 60°C'deki su banyosunda 3–4 dakika dairesel hareketler yapılarak ısıtıldı. Solüsyon homojen hale gelinceye kadar yaklaşık 10 sn. vortekslendi. Eğer homojen hale gelmediyse işlemler tekrarlandı. 6.0 ml "hybridization buffer"ı liyofilize CT/NG "probe reagent"i (PACE 2C probe reagent) içine kondu. 2 dakika oda ısısında tutuldu ve kullanılmadan önce 10 sn vortekslendi. Reajenin tamamen çözüldüğünden ve homojen olduğundan emin olundu.
- c. Çözünmüş prob: Buzdolabından çıkarıldıktan sonra 10 sn vortekslendi. 2 dakika süre ile 60°C'de döndürülerek ısıtıldı. Homojen hale getirildi. Kullanmadan önce 10 sn. vortekslendi.
- d. Ayırıştırma çözeltisi: Hazırlandıktan sonra oda ısısında 6 saat boyunca stabildir. Test sayısından 2 adet fazla olacak şekilde hesaplanarak hazırlandı.

Test sayısı	Seçici çözelti	Ayırıştırma çözeltisi
8+2	10ml	0,5ml
18+2	20ml	1.0ml
48+2	50ml	5ml
98+2	100ml	5ml

Ayırıştırma çözeltisi volümü (ml) = Seçici çözelti volümü (ml) /20

3. Hibridizasyon

- a. Tüplere örnek numaraları yazıldı. 3 negatif kontrol, 1 CT pozitif kontrol, 1 NG pozitif kontrol hazırlandı.
- b. Tüpler magnetik rak üzerindeki spora dizildi.
- c. Her örnek 5 sn vortekslendi.
- d. Örnekler ve kontrollerden 100 µl miktarında etiketli tüplerin dibine dağıtıldı.

- e. "Probe reagent" örneklere ve kontrollere tüp kenarlarına ve üst kısmına değdirilmeden tüpün dibine kondu.
- f. Tüplerin üzeri koruyucu kart ile kapatıldı.
- g. 3–5 kez sporu çalkalayarak karışması sağlandı.
- h. 60°C'lik su banyosunda tüpler 1 saat inkübe edildi ve su banyosu içinde yer değiştirmemelerine dikkat edildi.

4. Gereç Ve Malzemelerin Hazırlanması

Okuyucuda, saptama reajeni I-II'nin yeterli olup olmadığı kontrol edildi.

5. Seperasyon

- a. Tüpler su banyosundan çıkarıldı ve üzerlerindeki koruyucu kartlar atıldı.
- b. Her tüpe 1 ml iyice karıştırılmış ayrıştırma çözeltisinden koyuldu.
- c. Tüpler koruyucu kartlar ile kapatıp 3–5 kez sallayarak karıştırıldı. (Her tüpün baş tarafında köpük olmasına dikkat edildi.)
- d. Tüpler hemen 60°C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- e. Tüpler su banyosundan çıkarıldı. Koruyucu kartlar atıldı. Magnetik rak üzerinde, oda ısısında 5 dakika bekletildi.
- f. Magnetik rakla birlikte içindeki sıvı boşaltıldı. 2–3 kez karıştırıldı ve absorban bir kağıda 3 kez 5 sn. süre ile bastırıldı.
- g. Tüpler magnetik raktan ayrılmadan ağzına kadar yıkama sıvısı ile dolduruldu (Tüpün yan duvarından doldurmaya ve köpük kalmamasına dikkat edildi) ve 20 dak. oda ısısında inkübe edildi.
- h. Süpernatant atıldı. 2–3 kez sallayarak karıştırıldı. Bu basamakta absorban kağıda bastırılmadı.
- i. Tüplerin içinde yaklaşık 50–100 µl hacimde sıvı kaldı.
- j. Dipteki pelet sallanarak homojen hale getirildi.

6. Saptama

- a. Tüplerin dış yüzeyleri kurulandı.
- b. İlk sıraya 3 negatif kontrol, arkasına CT pozitif kontrol, daha sonra NG pozitif kontrol kondu. Daha sonra örnekler konarak okutuldu.

III. 4. 4. Sonuçlar

3 negatif kontrolün ortalaması alındı. 300 cut-off değerinin üzerine eklendi. Bu değer üzerinde örnekler pozitif olarak kabul edildi. Okuyucuda otomatik olarak okutuldu. Pozitif kontrol 300 RLU'nun üzerinde veya eşit olmalıdır.

III. 5. Test Sonuçlarının Analizi

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

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

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

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

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

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

G.P. : Gerçek pozitif olgu sayısı

G.N. : Gerçek negatif olgu sayısı

Y.P. : Yalancı pozitif olgu sayısı

Y.N. : yalancı negatif olgu sayısı

PPD : Pozitif prediktif değer

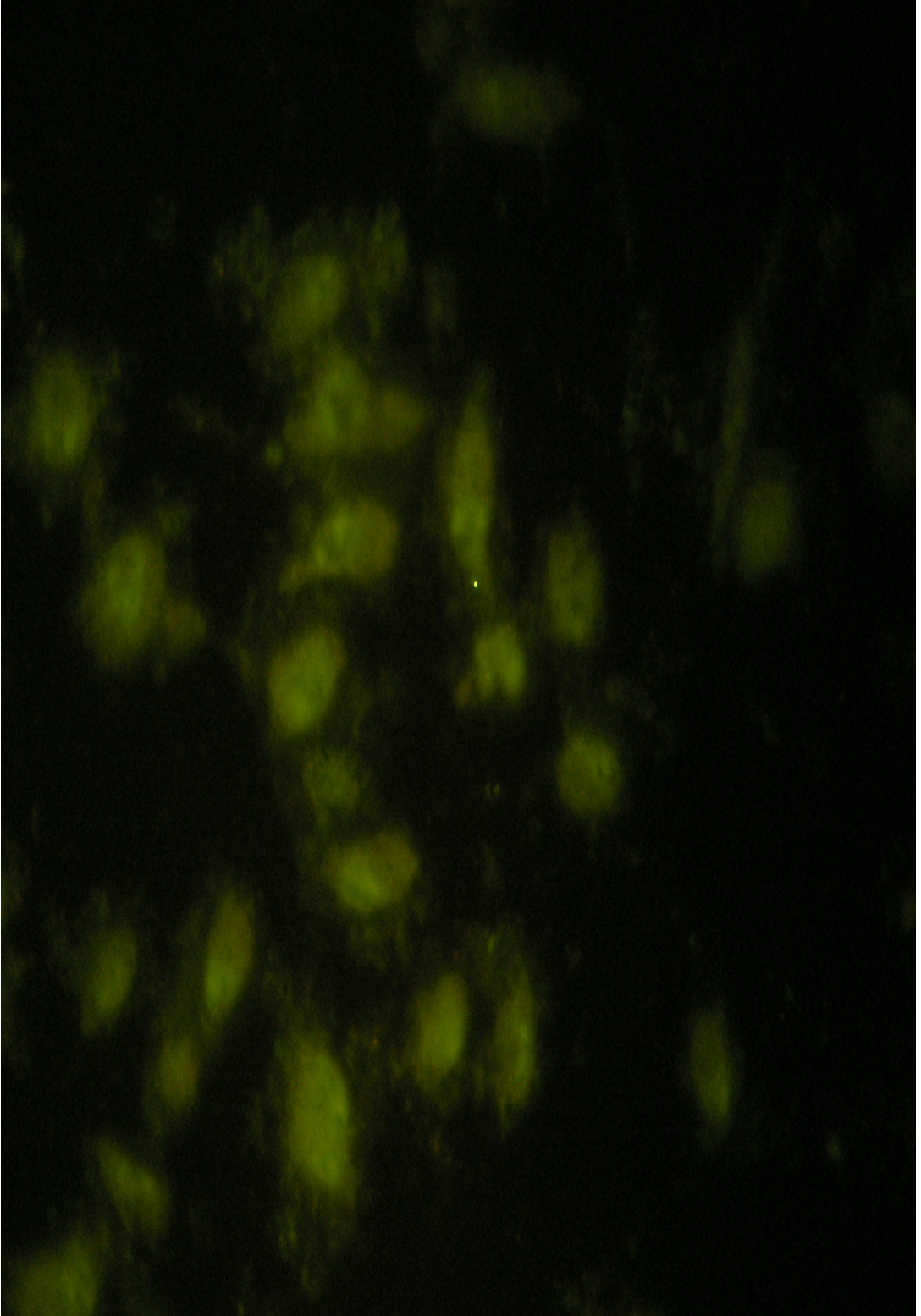
NPD : Negatif prediktif değer

İstatiksel değerlendirmede Ki-kare ve Fisher kesinlik testleri kullanıldı ve sonuçlar " Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS, v 13) paket programında değerlendirildi.

IV. BULGULAR

Tüp bebek merkezine başvuran 100 hastadan spekulum aracılığı ile yapılan fizik muayene sırasında endoservikal sürüntü örneği alındı. Örneklerin DFA bakışında, değerlendirilecek yeterli düzeyde hücre içerdikleri saptanarak nitelikli olarak kabul edildi. Örnekler hücre kültürü yöntemi referans alınarak değerlendirildi. Hücre kültürü değerlendirmesinde toplam 11 olguda (%11) *C. trachomatis* üremesi saptanırken kalan 89 (%89) olguda üreme görülmedi.

Hücre kültüründe üreyen *C. trachomatis* türe özgül FITC ile işaretlenmiş MOMP'a karşı monoklonal antikorlar ile boyanarak immunofloresan mikroskopunda değerlendirildi (Fotoğraf 1). Hücre kültürü ile *C. trachomatis*'in pozitiflik oranı %11,0 (11/100) bulundu.



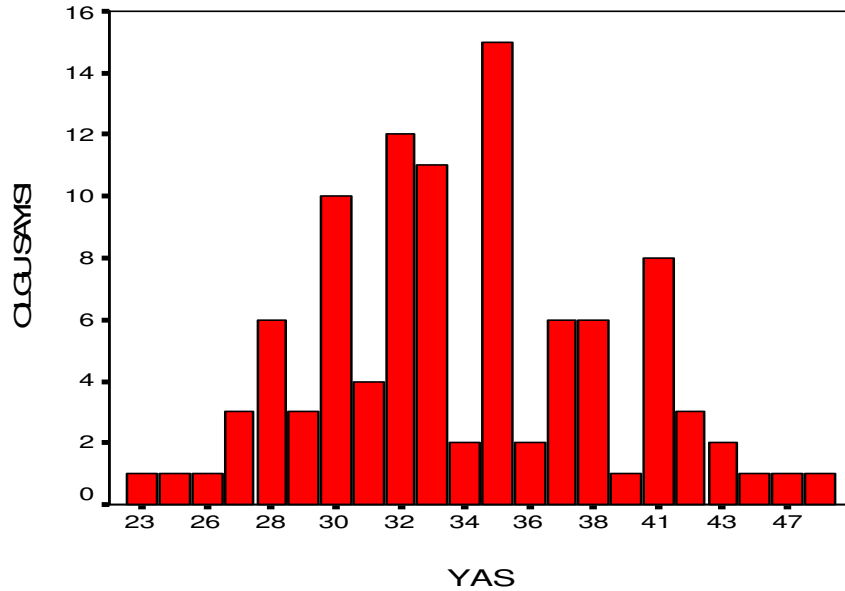
Fotoğraf 1: McCoy hücre kültüründe üretilmiş *C. trachomatis* inklüzyon cisimcikleri (x400)

100 örnek, flöresan ile işaretli *C. trachomatis*'e özgül monoklonal antikorların (anti-MOMP) kullanıldığı DFA ile ve nükleik asit hibridizasyon teknolojisini kullanarak *C. trachomatis* ve/veya *N. gonorrhoeae*'yı saptayabilen bir DNA probe testi olan PACE 2 CT/NG yöntemi ile çalışıldı. DFA ve PACE 2 CT/NG yöntemleri ile sırasıyla 7 (%7) ve 19 (%19) olgu pozitif, 93 (%93) ve 81 (%81) olgu ise negatif bulundu. (Tablo 1)

Tablo 1: Testlerin pozitif ve negatif sonuçları

	Hücre kültürü	DFA	PACE 2 CT/NT
Pozitif	11	7	19
Negatif	89	93	81
Toplam	100	100	100

Genel dağılıma bakıldığında yaş dağılımının 23–48 yaşları arasında olduğu (ortalama 34,15) gözlemlendi. Genel yaş dağılımı grafik 1'de gösterilmiştir.



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

Eğer daha önceden hiç gebelik olmamışsa bu durum primer infertilite olarak adlandırılır. Önceden geçirilmiş dış gebelik, boş gebelik, ölü doğum, erken doğum ya da canlı doğum gibi herhangi bir şekilde sonlanmış en az bir tane gebelik mevcut ise bu kez sekonder infertiliteden söz edilir. Hasta grubunu oluşturan kadınların 93'ünde (%93) sebep primer infertilite iken, 5'inde (%5) sekonder infertilite idi. 2 hasta anketinden ise bu konuda veri elde edilemedi.

Hasta grupları sistemik hastalıkları açısından sorgulandığında, bir hastada (%1) diabetes mellitus ve bir hastada da (%1) geçirilmiş tiroidektomi öyküsü ve guatr olduğu saptandı. Hiçbir hastada, diğer cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü bulunmamaktaydı.

2 hastada (%2) fizik muayenede servikal erozyon saptandı. Ancak iki hastadan da alınan örneklerde, kullanılan hiçbir yöntemle *C. trachomatis* saptanmadı.

Hastaların sadece bir tanesinde PID öyküsü ve antibiyotik kullanımı söz konusu idi. Bu hastada hücre kültürü ve hibridizasyon testleri ile *C. trachomatis* saptandı. Hastaların toplam 2 tanesinde (%2) antibiyotik kullanımı söz konusu idi. Diğer antibiyotik kullanımı öyküsü olan hastada ise PID öyküsü yoktu ve *C. trachomatis* hiçbir yöntemle saptanmadı.

Çalışma popülasyonuna ait anket verilerinin değerlendirilmesi tablo 2 de yapılmıştır.

Tablo 2: Çalışma popülasyonuna ait anket verilerinin değerlendirilmesi

Anket sonuçları	%
Sistemik hastalık	
DM	1
Endokrin Hastalık	1
Yapısal anomali	0
İnfertilite Sebebi	
Primer	93
Sekonder	5
PID Öyküsü	
Var	1
Yok	99
Antibiyotik kullanımı	
Var	2
Yok	98
Diğer Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar	
Öyküsü	0
Var	100
Yok	
Servikal Erozyon	
Var	2
Yok	98

DFA ve PACE 2 CT/NG yöntemleri ile elde edilen sonuçların hücre kültürü altın standart kabul edilerek yapılan değerlendirmesinde, DFA yöntemi ile pozitif bulunan 7 pozitif hastadan 1 tanesinde hücre kültürü ile uyumsuzluk saptandı. Bununla birlikte, DFA yöntemi ile negatif olduğu saptanan 5 olguda hücre kültürü ile pozitiflik söz konusu idi. PACE 2 CT/NG ile ise pozitiflik saptanan 19 hastadan 9'u hücre kültürü ile pozitif bulunurken, 10 hastada daha pozitiflik saptandı. Hücre kültürü ile pozitif bulunan 2 hasta ise PACE 2 CT/NG ile negatif bulundu. İki test arasında uyumsuzluğun olduğu 10 örnek için ayrı

ayrı PACE 2 CT ve PACE 2 NG test uygulanarak testler 2 kez tekrarlandı. Sonuçlar *C. trachomatis* için "cut off" değerinin üç katı üzerinde RLU değerlerine sahip bulundu. Sonuçlar ikinci kez PACE 2 CT ile tekrarlandığında "cut off" değeri 362 RLU, pozitif bulunan örneklerde en düşük RLU 1694, enyüksek RLU ise 41858 olarak saptandı. Tüm hastaların sonuçları *C. trachomatis* olarak değerlendirildi. (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3: PACE 2 CT/NG Ve Hücre Kültürü İle Elde Edilen Sonuçlar

		Hücre Kültürü		Toplam
		+	-	
PACE 2 CT/NG	+	9	10	19
	-	2	79	81
Toplam		11	89	100

Tablo 4: DFA Ve Hücre Kültürü İle Elde Edilen Sonuçlar

		Hücre Kültürü		Toplam
		+	-	
DFA	+	6	1	7
	-	5	88	93
Toplam		11	89	100

Her olgu için elde edilen DFA, PACE 2 CT/NG ve hücre kültürü sonuçları karşılaştırıldığında; toplam 3 olguda, tüm yöntemlerle pozitif sonuç elde edildi. Toplam 79 hastada ise her üç yöntemle de negatiflik saptandı. Her üç testin uygunsuz olduğu olgu sayısı 18'di.

Hücre kültürü ile DFA testi sonuçları karşılaştırıldığında, duyarlılık %54,5, özgüllük %98,9, pozitif prediktif değer %85,7, negatif prediktif değer %94,6 ve test geçerliliği %94,0 olarak bulundu. Hücre kültürü ile PACE 2 CT/NG test sonuçları karşılaştırıldığında ise duyarlılık %81,8, özgüllük %88,8, pozitif prediktif değer %47,4, negatif prediktif değer %97,5 ve test geçerliliği %88 olarak bulundu.

11 hastanın hücre kültürü sonuçlarına göre *C. trachomatis*'in prevalansı % 11 olarak bulundu. *C. trachomatis*'in prevalansı sadece altın standart olarak kabul edilen hücre kültürü sonuçlarına göre hesaplandı.

V. TARTIŞMA

Bu çalışmanın tartışması *C. trachomatis* infeksiyonlarının görülme sıklığı, yöntemlerle ilgili uygulamada karşılaşılabilecek olası alt konu başlıkları olarak incelenmiştir.

V.1. Görülme Sıklığı

Son yıllarda cinsel yolla bulaşan hastalıkların tanı ve kontrolüne yönelik büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen bu hastalıkların insidansları hızla artmaya devam etmektedir. Tüm dünyada her yıl yaklaşık 92 milyon yeni *C. trachomatis* infeksiyonu olduğu öngörülmektedir (23). Bu sayının Amerika Birleşik Devletleri'nde 3 milyon ve Avrupa'da 10 milyon olduğu bildirilmektedir. *C. trachomatis* infeksiyonlarının görülme sıklığındaki bu artışı etkileyen en önemli faktörlerden birisi, infeksiyonun yüksek oranda asemptomatik seyretmesi ve bunun sonucu olarak da bakterinin hızla yayılma olanağı bulmasıdır. Dolayısıyla, geniş tarama programlarıyla infeksiyonların tanımlanması ve tedavi edilmesi, gerek ciddi komplikasyonların önlenmesi gerekse yayılımın sınırlandırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde tarama programlarının uygulanmasıyla *C. trachomatis* pozitiflik oranında %60'dan fazla azalma olduğu ifade edilmektedir (50).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, cinsel aktif popülasyonda *C. trachomatis* görülme oranı %10, cinsel hastalıklar kliniğine başvuran hasta popülasyonunda ise %25–40 olarak bildirilmektedir. İnfekte annelerden

doğan bebeklerde bu infeksiyona yakalanma oranı yaklaşık % 65'tir (51). Avrupa'da genç kadınlarda *C. trachomatis* infeksiyon prevalansı %4,1–25, erkeklerde ise %1,3–12 arasında değişmektedir (23).

Türkiye'de *C. trachomatis* infeksiyonlarının genel sıklığını gösteren kapsamlı çalışmalar henüz bildirilmemiş olmasına karşın İstanbul ve İzmir'de yapılan bazı çalışmalar bu bölgelerdeki prevalans hakkında genel bir fikir vermektedir (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32). İstanbul'da Genç ve arkadaşlarının (30) yaptığı bir çalışmada *C. trachomatis* sıklığı gebe kadınlarda %1,1 olarak bildirilmiştir. Yılmaz ve arkadaşlarının (31) çalışmasında ise, hayat kadınlarda %22 olarak bulunmuştur. Ağaçfidan ve arkadaşlarının (32) yaptığı bir çalışmada, hayat kadınları ile ilişki kuran erkeklerde %14,7 oranında genital klamidya infeksiyonu saptanmıştır. İzmir bölgesinde yapılan çalışmalarda; klamidya infeksiyon insidansının asemptomatik kadınlarda %20–27,3, semptomatik kadınlarda %5,2–42, semptomatik gebe kadınlarda %8,8, infertil kadınlarda %8,5–11,5, genelev kadınlarında ise %25,4 olduğu bildirilmiştir (24, 25, 26, 27, 28, 29).

Ülkemizde *C. trachomatis*'e ilişkin hücre kültürüne dayalı çok çalışma bulunmamaktadır. Tüp bebek merkezine başvuran klinik yakınması olan veya olmayan 100 infertil olgu üzerinde yürütölen çalışmamızda, *C. trachomatis* pozitifliğinin araştırılması amaçlanarak alınan endoservikal sürüntü örnekleri hücre kültürü, DFA ve PACE 2 CT/NG ile incelenmiştir. Hücre kültürü ile %11, DFA ile %7, PACE 2 CT/NG ile %19 oranında pozitiflik saptanmıştır.

Asemptomatik *C. trachomatis* infeksiyonları infertilite ve ektopik gebeliğin önemli bir sebebidir. Bunun sebebi; belirgin semptomların olmamasına rağmen kronik ve fulminan seyirli olması ve sonuçta infeksiyonun üst genital sisteme yayılarak salpenjite yol açmasıdır (33). Seroepidemiyolojik çalışmalar ile asemptomatik olmalarına ve PID öyküleri olmamasına rağmen tubal patolojiye sahip infertil kadınların serumlarında *C. trachomatis* antikörleri saptanmıştır. *C. trachomatis*; ektopik gebelik (%9), tubal faktörlere bağlı infertilite (%20) ve kronik pelvik ağrıya (%18) neden olan PID'nin önde gelen etkenidir. İnfeksiyonun asemptomatik seyri, komplikasyonların ciddiyeti

ve ekonomik kayıpların büyüklüğü infeksiyonun kontrolünde taramanın önemini göstermektedir (52, 53).

Ülkemizde, klinik yakınması olmayan kadınların rutin kontrol amacıyla hastaneye başvurmaları olağan bir durum değildir. Toplum genelinde elde edilen verilerin çoğu *C. trachomatis* antikor pozitifliğini yansıtan çalışmalardan elde edilmiştir ve asemptomatik kadınlarda jinekolojik muayene yapılmadığından ya da yapılsa bile klamidya açısından endoservikal örnek alınmadığından, antijen aramaya yönelik çalışmalar kısıtlıdır. Çalışma grubumuzdaki kadınlar, tüp bebek merkezine başvuran ve rutin kontrolleri yapılan hastalardır. Çalışmada incelenen infertil hastalardan, PID öyküsü olan tek hastada hem altın standart yöntem olan hücre kültürü ile hem de PACE 2 CT/NG ile *C. trachomatis* saptanmıştır. Çalışmada, asemptomatik olmalarına rağmen 11 olguda hücre kültürü ile *C. trachomatis* infeksiyonu varlığı saptanmıştır. Hücre kültürü ile elde edilen sonuçlar, İzmir bölgesinde Ertem ve arkadaşlarının (26) yaptığı çalışmada infertil hastalarda saptadıkları oranlarla uyumlu bulunmuştur. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, yakınması olsun veya olmasın erken tanı ve tedavi için tarama programlarının uygulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Kanada'da yapılan bir çalışmada *C. trachomatis* ile infekte kadınların %72'si 15–24, %24'ü 25–39, %2'si ≤ 14 , %2'si de ≥ 40 yaş gruplarında saptanmıştır (54). Amerika Birleşik Devletleri'nde de *C. trachomatis* infeksiyonlarının yaş gruplarına göre dağılımında, en riskli yaş grubunun 20 yaş altındaki cinsel aktif genç kadınlar olduğu bildirilmiştir (33, 55). Bu durumun nedenleri arasında özellikle genç kadınlarda skuamo-kolumnar birleşme bölgesinde görülen farklılıklar nedeni ile *C. trachomatis*'in infeksiyona duyarlı olan kolumnar epitele ulaşması ve bu bölgeyi tutması, genç kadınlarda daha kolay olmaktadır (33) .

Çalışmamızda incelenen 100 olgunun yaşları 23 ile 48 arasında değişmekteydi. Hücre kültürü ile pozitiflik saptanan hastaların yaş ortalaması ise 34,8 olarak saptandı. Sonuçlarımız Ertem ve arkadaşlarının (25) yaptığı tarama çalışması ile uyumludur. Araştırmacılar en yüksek infeksiyon oranlarını 30-40 yaş grubunda bildirmiştir. Çalışmamızda hasta grubunun

tümünün evlilik nedeniyle cinsel yönden aktif olması ve hastaların genellikle 30–35 yaş aralığında tüp bebek merkezine başvurarak incelenen hastalar olması diğer çalışmalarla karşılaştırılmasını olanaksız kılmaktadır.

V.2. Yöntemlerle İlgili Uygulamada Karşılaşılabilecek Olası Sorunlar

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

1. Örneklerin Alınması İle İlgili Sorunlar:

Yapılacak testler için gerekli olan uygun özellikte örneklerin alınması, çalışma sonucunu birincil olarak etkileyen ilk ve en önemli aşamadır. Hücre kültürüne olası toksik etkileri ve sonuçları etkilemesi olasılığı nedeniyle çalışılacak örneklerin hemorajik olmamasına dikkat edilmiştir. Kanın içindeki kompleman gibi maddeler hücre serilerine toksiktir. Hücre kültüründe kullanılan FBS'nin ısı ile inaktive edilmesinin nedeni de budur. Toplanan örneklerde yeterli sayıda hücre olmaması DFA ve hücre kültürü için önemli bir sorundur (33).

Örnek alımı sırasında toplanan örneğin kalitesinin etkileyen önemli bir diğer faktör de yanlış olumluluklara neden olacağı için ekzoservikal mukus bulaşıcıdır. Örnek alımı yapılmadan önce ekzoservikal mukusun temizlenmesi gerektiği konusunda klinisyen bilgilendirilmiştir (33).

Kadınlarda servikal sürüntülerle birlikte üretral sürüntü örneği alınmasının kültür duyarlılığını %23 arttırdığı bildirilmiştir (39,56). Bu çalışmada tarama testlerinin etkinlikleri yalnızca servisit etkeni olan *C. trachomatis* infeksiyonlarında araştırıldığından üretral sürüntü örneği alınmamıştır.

2. Örneklerin Taşınması İle İlgili Sorunlar:

Hücre kültüründe; toplanan örneklerin işlemleninceye kadar bulunduğu taşıma ortamları testlerin sonuçlarını doğrudan etkileyebilen bir faktördür. Örneğin, taşıma ve saklama koşullarının uygun olmaması testin duyarlılığını olumsuz yönde etkiler. Çalışma sırasında, poliklinik şartlarında alınan örnekler +4°C'de saklanmış ve gün sonunda biriktirilerek laboratuvara ulaştırılmıştır. Hemen işleme alınmayacak örnekler -70°C'de saklanmıştır. Örneklerin taşınması sırasında herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır. Özellikle hücre kültürü uygulaması için transport sırasında da soğuk zincirin bozulmamasına özen gösterilmiştir (33). Örnek transportunun 24 saatten fazla sürdüğü birçok laboratuvarda, bu gecikmenin kültürün duyarlılığında %55–65 gibi oranlara kadar düşmeye neden olduğu bilinmektedir (57). Ruij ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, örnek alındıktan sonra hemen yapılan hücre kültürüne göre gecikmiş kültür sonuçlarının daha yetersiz olduğu ortaya konmuştur (58). DFA ve PACE 2 CT/NG'de ise soğuk zincire ve canlı mikroorganizmaya gereksinim olmaması bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

3. Araç, Gereç Ve Donanım İle İlgili Sorunlar:

Alt yapı, tanısal testlerin uygulanabilirliği konusunda önde gelen sorunlardan biridir. Bu çalışmada karşılaştırılan testler gerekli donanım ve araçlar açısından değerlendirildiğinde; DFA testi kit içeriği haricinde pipet, şale, immün flöresan mikroskobu, sitospin cihazı gibi malzemeler gerektirmektedir.

Hücre kültürünün tanıda kullanılabilirliğini sınırlayan faktörler hücre kültürü sisteminin kurulmasının yüksek maliyetli olması, güvenlik kabini, inkübatör, buzdolabı, dondurucu, inverted mikroskop ve immün flöresan mikroskobu gerektirmesidir. Bu durum hücre kültürünün geniş tarama programlarında bir tanı metodu olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır (59). Pace 2 CT/NG testinde de su banyosu, magnetik rak ve sonuçların değerlendirilmesi için

Okuyucunun laboratuvarda bulunması şarttır. Dolayısıyla kullanılacak testin seçiminde tercih yapılırken, laboratuvar şartlarının da göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

4. Sonuçların değerlendirilmesi ile ilgili sorunlar:

İmmün flöresan yöntemle boyanmayı takiben değerlendirmenin deneyimli gözle yapılmasının büyük önemi bulunmaktadır. Özellikle boya artıklarının ve non-spesifik boyanmaların ayırt edilmesi ve yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmemesi, alanların yetersiz derecede incelenmemesi, az sayıda hatta bazen tek bir inklüzyon cisimciği içeren örneklerde yanlış negatiflikler düşünülmemesi için bu şarttır. Bu çalışmada bu durumun mümkün olduğunca ortadan kaldırılması amaçlanmış, bu konuda pratik ve teorik eğitim alınmış ve örnekler 2 değerlendirici tarafından incelenmiştir.

DFA'da da hücre kültüründeki değerlendirme sorunları söz konusudur, hatta değerlendiricinin deneyimi daha da ön plandadır. Bu yöntemin uygulanmasında seçilen monoklonal antikorların tipi de önemlidir. DFA tekniğinde kullanılan işaretli antikorlardan MOMP'a özgül olanların, elementer cisimleri LPS'e özgül olanlara göre, daha parlak, belirgin ve tipik olarak boyadığı bilinmektedir.

Bu çalışmada *C. trachomatis*'in MOMP antijenine özgül olan FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikorları içeren ticari kit Fluorotect® Chlamydia (Omega Diagnostics) kullanıldı. Bu nedenle elementer cisimlerin tanımlanması ile ilgili bir sorunla karşılaşılmadı. Elementer cisimler, oval veya yuvarlak, parlak elma yeşili flöresan veren, konak hücrelere göre çok küçük olan tipik morfolojide seçilebildi.

DFA'da 3–10 inklüzyon cisimciği görülmesi gerekmesi yüksek bir sayı gibi görünse de, diğer flöresan veren maddelerin de tanıya dahil edilebilme olasılığına karşı şarttır. Flöresanın değerlendirilmesi ile ilgili zorluklar deneyimi olmayan personel tarafından kullanılmasını olanaksız kılmaktadır. Aynı zamanda örnek miktarı da DFA için kısıtlayıcı bir faktördür (55).

Çalışmada incelenmeye değer olabilmesi için, her sürüntü örneğinin en az 25 kolumnar epitel hücresi içermesi şartı da göz önünde bulunduruldu.

PACE 2 CT/NG ise değerlendirme sırasında deneyimli bir personel gerektirmemektedir. Sonuçlar okuyucuda otomatik olarak okutulur ve cut-off hesaplanarak örneklerin RLU değerleri belirlenir. Bu durum, sonuçların değerlendirilmesi açısından bakıldığında PACE 2 CT/NG'nin diğer testlere göre daha kullanışlı olduğunu göstermektedir.

5. Testlerin Sonuca Ulaşma Süreleri:

DFA yönteminde yaklaşık 30 dakikada sonuç elde edilmektedir. PACE 2 CT/NG ile sonuç elde edilene kadar geçen süre yaklaşık 2–3 saattir. Her iki yöntem de hızlı sonuç vermektedir. Hızlı sonuç verme, tarama testlerinde aranılan bir özelliktir. Çünkü hızlı tanı konması sayesinde çabuk ve etkin bir tedaviye başlanabilmektedir. Hücre kültürü ile ise sonuçların alınması için ortalama 48 saate ihtiyaç vardır. Bu hücre kültürünün en önemli dezavantajlarından biridir (9).

V.3. DFA Sonuçlarının Karşılaştırmalı Çözümlemesi:

DFA yönteminde kullanılan ticari kitle, cinse özgül klamidyal LPS antijenine karşı oluşan Anti-LPS antikoru veya *C. trachomatis*'in MOMP antijenine karşı oluşan türe özgül antikordardan birini içerir. Bu çalışmada DFA uygulaması, *C. trachomatis*'in MOMP antijenine özgül olan FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikoru içeren bir ticari kit olan Fluorotect® Chlamydia (Omega Diagnostics) ile yapılmıştır.

Hücre kültürü altın standart kabul edilerek, hücre kültürü ile DFA testi sonuçları karşılaştırıldığında, duyarlılık %54,5, özgüllük %98,9, pozitif prediktif değer %85,7 ve negatif prediktif değer %94,6 olarak bulundu.

DFA testi, tıpkı hücre kültürü gibi klamidyal inklüzyonların ve/veya elementer cisimlerin ayırıcı biçim ve boyanma özelliklerinin görüntülenmesi temeline dayandığından, özgüllüğü bu denli yüksek saptanabilmektedir.

MOMP'a ilişkin monoklonal antikorların kullanıldığı DFA yöntemi, hızlı sonuç veren *C. trachomatis* testleri içinde en özgül olanıdır. Ancak yine de bu testin doğru olarak değerlendirilebilmesi için deneyime gereksinim vardır. Özellikle <10 sayıda elementer cisim saptanan örneklerde testi tekrarlama doğru tanı açısından uygun bir yaklaşımdır (33). Çok sayıda çalışmada ürogenital klamidya infeksiyonu tanısı için laboratuara gönderilen örneklerin en az %10'unun uygunsuz olduğu (üretral/servikal kolumnar epitel içermediği veya eksüda içerdiği) gösterilmiştir. Bazı durumlarda bu oranın %30'a kadar çıktığı bildirilmektedir. Çalışmamızda da bu durum göz önüne alınarak örnekler buna uygun olarak incelenmiş ve yetersiz olan örnekler, preparatların hazırlanmasından kaynaklanan problemler olacağı düşünülerek yeniden hazırlanarak test tekrar edilmiştir.

DFA hızlı bir test olmasına karşın duyarlılığı düşüktür (%50–70), düşük prevalanslı bölgelerde yanlış pozitiflik oranları yüksektir ve örnek sayısının az olduğu laboratuvarlarda önerilmektedir (60). Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızdan elde edilen değerler ve prevalans birlikte değerlendirildiğinde bu oranlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

V.4. PACE 2 CT/NG Sonuçlarının Karşılaştırmalı Çözümlemesi:

Hücre kültürü ile PACE 2 CT/NG test sonuçları karşılaştırıldığında ise duyarlılık %81,8, özgüllük %88,8, pozitif prediktif değer %47,4 ve negatif prediktif değer % 97,5 olarak bulundu.

PACE 2 CT/NG ile pozitiflik saptanan hücre kültürü negatif sonuçların sebebinin; transport besiyerlerindeki farklılık, örnekte canlı mikroorganizmanın bulunmaması, örneğin niteliğinin iyi olmaması ve taşınması sırasında uygun olmayan koşullara maruz kalması gibi nedenlerle açıklanabileceği düşünülmüştür. Klamidyal nükleik asit testlerinde, örneğin alınması ve taşınması sırasında *C. trachomatis*'in canlı olup olmaması test için bir dezavantaj değildir. Ayrıca PACE 2 CT/NG negatif-kültür pozitif örneklerin nedeni, *C. trachomatis*'in miktarının PACE 2 CT/NG testi ile

saptanamayacak derecede düşük olması veya örneklerin hazırlanma aşamasındaki hatalardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

İki test arasında uyumsuzluğun olduğu 10 örnek için testler 2 kez tekrarlanmış ve önceki çalışmalara dayanılarak, sonuçlar "cut off" değerinin üç katı üzerinde RLU değerlerine sahip bulunduğundan hücre kültürü negatif olsa da sonuçlar gerçek pozitif olarak kabul edilmiştir. Burada hücre kültüründeki negatifliğin, uygunsuz transport koşullarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. (61, 62)

PACE 2 CT/NG uygulaması sırasında magnetik rak kullanımı gibi birtakım kontaminasyonu önleyici yöntemlerle yanlış pozitiflikler azaltılmaya çalışılmaktadır. Aynı örnekle testin tekrarı ile aynı sonucun ikinci kez elde edilmeye çalışılması da bu konuda yardımcı olabilir. Sonucu tekrar ile doğrulanamayan örnekler için kontaminasyon düşünülebilir. Bu nedenle örneğin aynı testle bile olsa tekrarı, pozitif sonucun geçerliliği için önerilmektedir. Yine de, farklı bir yöntem kullanılmadığı için doğrulama testi olarak kabul edilemez. Ancak, doğrulama için farklı bir test yapılması da, yeni örneğe ihtiyaç olması nedeniyle pratik bir yaklaşım değildir. İkinci bir teste tabi tutulabileceği düşünülerek örneklerin işlemlenmesi gerekir ki bu da zaman alıcıdır. Elde edilen test sonuçları için bir gri bölge tanımlanmış ve bu örnekler için bir algoritma önerilmiştir. Bu sonuçların, bir doğrulama testi ile kanıtlanması önerilir. PCR doğrulama için kullanılabilir. (63). Bu şekilde testlerin tam performansları değerlendirilebilir.

Düşük prevalanslı toplumlarda hibridizasyon testi seçildiğinde, doğrulama testinin gerekliliği göz önüne alınarak; PACE 2 CT/NG testinin bir doğrulama testi ile konfirme edilmesi planlanmış ancak gerçekleştirilememiştir.

Yüksek prevalanslı bölgelerde testin duyarlılığı büyük önem taşır. Eğer düşükse mutlaka ayrıntılı incelenmesi gerekir. Kültür dışı yöntemler klamidya infeksiyonu tanısında objektif ve hızlı tanı avantajını sunar. Ancak bu testlerin uygulanabilirliğinin incelenmesinde hasta çıkarı ön planda tutulmalı, yanlış pozitif ve yanlış negatifliklerin sayısı, neden olabilecekleri gereksiz tedavi veya sekeller açısından tanı testinin uygunluğuna karar vermede dikkate

alınmalıdır (64). Tarama testlerinin değerlendirilmesinde asemptomatik düşük prevalanslı populasyonlar hedef olmalıdır.

İncelenen testin uygulanabilirliğinin değerlendirilmesinde göz önüne alınması gereken nokta, testin uygulanacağı bölgede, o hastalığın prevalansına göre testin PPV ve NPV değerinin değişeceği. %10 prevalans altındaki bölgelerde yalancı pozitiflik oranlarının arttığı gözlenmektedir. Prevalans düşük olduğunda, altın standart yöntemin veya hibridizasyon testlerinin kullanılması önerilmektedir (65).

PACE 2 CT/NG testi pahalı bir test olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, bu noktada maliyet/yarar analizinin yapılması önemlidir. Klamidya infeksiyonlarının ekonomik sonuçları ile ilgili yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Maliyet yarar/zarar analizleri yapıldığında klamidya infeksiyonlarının ülkelere getirdiği ekonomik yük oldukça yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde *C. trachomatis*'e bağlı pelvisin inflamasyonlu hastalığının yılda 3,5 milyar dolarlık bir maliyet oluşturduğu saptanmıştır. Toplam maliyetin dörtte üçünü, tedavi edilmeden geçirilen basit infeksiyonlardan sonra gelişen sekeller oluşturmaktadır. Koruma ve kontrol programları doğru yapıldığında maliyet yükü minimum düzeye inmektedir.

Bu çalışmada, *C. trachomatis*'in servikal örneklerde saptanmasında bir doğrulama testi ile birlikte kullanıldığında PACE 2 CT/NG testinin hücre kültürü testine bir alternatif oluşturduğu görülmüştür. PACE 2 CT/NG testinin özellikle çok sayıda örnek taramalarında uygulanması son derece kolaydır ve hücre kültürüne göre daha kısa sürede sonuçlar elde edilmektedir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüp bebek merkezine başvuran 100 infertil olgu üzerinde yürütülen çalışmamızda hücre kültürü sonuçlarına göre *C. trachomatis*'in prevalansı % 11 olarak bulundu. Bu oran yurdumuzda ve dünyadaki çeşitli yayınlarda bildirilen oranlarla uyumludur. Özellikle pelvik inflamatuvar hastalık, ektopik gebelik ve tubal infertilite gibi sonuçlara yol açması erken ve doğru tanının önemini ortaya koymaktadır. Klamidya prevalansı ile ilgili çalışmaların yapılması tarama programlarının toplumun hangi gruplarına yönelik olacağına karar verilmesi açısından da önem taşımaktadır.

Hücre kültürü yönteminde laboratuvaradan laboratuvara duyarlılık ve özgüllüğün değişkenlik gösterebilmesinden ötürü, klamidya infeksiyonlarının tanısında alternatif teknolojiler geliştirilmiştir. Bu çalışmada, *C. trachomatis*'in servikal örneklerde saptanmasında PACE 2 CT/NG testinin hücre kültürü testine bir alternatif oluşturduğu görülmüştür. Hücre kültürü ile pozitif olan 2 örnekte PACE 2 CT/NG testi yetersiz kalmıştır. Buna örneklerin düşük sayıda inklüzyon cisimciği içermeleri nedeniyle *C. trachomatis*'in hibridizasyonla saptanamaması sebep olmuş olabilir. Ancak bu hasta grubunda PACE 2 CT/NG testi hücre kültürüne, 10 pozitif hasta daha bularak katkıda bulunmuştur. Negatif hücre kültürü sonuçlarının transport koşullarındaki yetersizlik ve örnekte canlı mikroorganizmanın olmaması ile ilişkili olduğu öngörülmektedir. DFA yöntemi kolay uygulanabilir ve hızlı bir test olsa da uygulayan kişinin deneyiminin büyük önem taşıması ve düşük duyarlılık oranları testin kullanımını sınırlandırmaktadır. Örnek sayısının az olduğu laboratuvarlarda önerilebilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, acil sonuç istenen veya tarama nedeniyle çoklu örnek gönderilen durumlarda hibridizasyon testlerinin kullanılabilceği görüşüne varılmıştır. PACE 2 CT/NG testi doğrulama testi ile birlikte uygulandığında, hücre kültürü yerine kullanılabilcek özgül ve kolay uygulanabilir bir testtir. Ancak; klinik örneklere rutin şartlarda standart hücre kültürü tekniğinin uygulanması yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle tercih edilmelidir.

VII.ÖZET

Cinsel temasla bulaşan hastalıkların önemli bir etkeni olarak karşımıza çıkan *Chlamydia trachomatis* infeksiyonlarının kapsamlı bir şekilde araştırılması her geçen gün önemini arttırarak devam etmektedir. İnfeksiyonun Türkiye'deki durumu ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Bu konuda yapılacak ayrıntılı çalışmalar klamidya infeksiyonlarının tanısında yeni gelişmelerin oluşmasına katkıda bulunacaktır. Halen kullanılan yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğünü araştıran çalışmalar devam etmekte, hangi testin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmasının daha verimli olacağı tartışılmaktadır.

Bu çalışmada, altın standart olarak kabul edilen hücre kültürünü, hızlı tanıda kullanılan antijen arama yöntemlerinden direkt flöresan antikor (DFA) testini ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip hibridizasyon testini (PACE 2 CT/NG) karşılaştırıldı. 100 infertil kadından alınan endoservikal sürüntü örneğinde, hücre kültürü yöntemi ile 11 örnekte *C. trachomatis* pozitif bulundu ve prevalans %11 olarak saptandı. DFA ve hibridizasyon testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %54,5 ve %81,8, özgüllükleri ise sırasıyla %98,9 ve %88,8 olarak bulundu.

Sonuç olarak; *C. trachomatis* tanısında, hücre kültürü uygun örnek alındığında ve transport koşullarına uyulduğunda halen önemini korumaktadır. Hibridizasyon testi doğrulama testleriyle birlikte yapıldığında özellikle tarama testi ve hızlı sonuç çıkarılması gereken durumlarda uygun olduğu, DFA testinin ise düşük duyarlılığı nedeniyle örnek sayısı az olan, olanakların kısıtlı olduğu laboratuvarlarda, deneyimli kişi tarafından

değerlendirildiğinde *C. trachomatis* tanısında kullanılabilir olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: *Chlamydia trachomatis*, DFA, hibridizasyon testi, hücre kültürü

VIII.SUMMARY
THE COMPARISON OF CELL CULTURE, HYBRIDIZATION
AND DIRECT FLOURESCENT ANTIBODY TESTS IN
***CHLAMYDIA TRACHOMATIS* DIAGNOSIS**

The importance of the comprehensive studies on *Chlamydia trachomatis*, which is an important cause of sexually transmitted diseases, increases day by day. There is no sufficient data on the condition of the infections in Turkey. The detailed studies on this matter will contribute newly developments on diagnosis of chlamydia infections. The studies on the sensibility and specificity of the current methods still continue and the discussions for determination of the efficient test to be used in microbiology laboratory are carried out

In our study, we have compared the cell culture, which is accepted as gold standart, direct fluorescent antibody (DFA) test, which is an antigen detection method utilized in rapid diagnosis and PACE 2 CT/NG, which is a high sensitive and specific hybridization test. We have determined 11 positive results and %11 prevelance in the endocervical swab cell culture obtained from 100 infertile women. Respectively, the sensibility of the DFA and hibridization tests are determined as %54,5 and %81,8, the specificity is determined as %98,9 and %88,8.

Consequently, the cell culture keeps its importance in *C. trachomatis* detection if adequate sample is obtained. We have reached the result that hybridization test is acceptable especially as a screening test if applied together with confirmation tests, due to its low sensibility DFA test could be utilized in *C. Trachomatis* diagnosis if it is made by an experienced personnel in laboratories where samples and facilities are limited

Key words: Chlamydia trachomatis, DFA, hybridization test, cell culture.

IX. EKLER

Hasta Formu

1) Soyadı-Adı :

2) Dosya No :

3) Doğum Tarihi :

4) Sistemik Hastalık :

€ Diabetes Mellitus

€ Endokrin hastalık

€ Yapısal anomali

5) İnfertilite Sebebi :

€ Primer

€ Sekonder

6) PID Öyküsü :

€ Var

€ Yok

7) Antibiyotik Kullanımı :

€ Evet

€ Hayır

8) Diğer Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar Öyküsü :

€ HIV

€ Hepatit B

€ Hepatit C

€ Gonore

€ Sifiliz

€ Herpes simplex

9) Servikal Erozyon:

€ Var

€ Yok

X. KAYNAKLAR

1. Mahony JB, Coombes BK, Chernesky MA. Chlamydia and Chlamydophila. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington , 2003; 991.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology 3rd ed. Missouri: Mosby,Inc;1998:362-370
3. Özbal Y. Klamidyalar. Ş Ustaçelebi,(ed); Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabında, Ankara: Güneş Kitabevi yayınları, 1999: 705
4. Önel M, Ağaçfidan A. Chlamydia infeksiyonları: dünü, bugünü ve geleceği. III. Ulusal Chlamydia infeksiyonu simpozyumu, Program ve Simpozyum Kitabı, Afyonkarahisar, 2006: 15-23
5. Moulder JW. The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. Ann. Rev. Microbiol. 1966; 20: 107-130
6. Sarov I, Becker Y. RNA in the elementary bodies of Trachoma agent. Nature. 1968; 217: 849-852
7. Sarov I, Becker Y. Trachoma agent DNA. J. Mol. Biol. 1969; 42: 581-589
8. Weiss E. Adenosine triphosphate and other requirements for the utilization of glucose by agents of the psittacosis-trachoma group. J. Bacteriol. 1965; 90: 243-253
9. Barnes RC. Laboratory Diagnosis of Human Chlamydial Infections, Clin Microbiol Rev 1989; 27: 119-136
10. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of C. trachomatis attachment to eucaryotic host cells. Cell 1992; 89: 881-889

11. Moulder J W. Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. Microbiol. Rev. 1991; 55: 143-190
12. Ustaçelebi Ş: Bacteriology and molecular biology of Chlamydiae In: Serter D et al. FEMS Workshop Human Chlamydial Infections. İzmir Ege Üniversitesi Basımevi Bornova, 1997; 9-23
13. Mpiga P, Ravaoarinoro M. *Chlamydia trachomatis* persistence: An update Microbiol Res 2006; 161: 9-19
14. Newhall WJ, Jones BR. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane proteşn of chlamydia. J. Bacteriol. 1983; 154: 998-1001
15. Freudlund H, Falk L, Jurstrand M, Unemo M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. APMIS 2004; 112: 771-784
16. Jantos CA, Heck S, Roggendorf R, Sen-Gupta M, Hegemann JH. Antigenic and molecular analyses of different Chlamydia pneumoniae strains. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 620-623
17. Allen JE, Stephens RS. Identification by sequence analysis of two-site posttranslation processing of the cystein-rich outer membrane protein 2 of *Chlamydia trachomatis* serovar L2. J. Bacteriol. 1989; 171: 285-291
18. Neuer, S.D. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks and S.S. Witkin. The role of heat shock proteins in reproduction Human Reproduction Update. 2000; 6(2): 149-159
19. Kaul R, Chong KL, Wenman WM. Initial characterization of a chlamydial receptor on mammalian cells. FEMS Microbiol Lett. 1989; 48(1): 65-9
20. Kaul R, Roy KL, Wenman WM. Cloning, expression, and primary structure of a *Chlamydia trachomatis* binding protein. J Bacteriol. 1987; 169(11): 5152-6
21. Zarakolu P. Cinsel temasla bulaşan infeksiyonlar Kontrol programı ve Chlamydia. III. Ulusal Chlamydia infeksiyonu simpozyumu, Program ve Simpozyum Kitabı, Afyonkarahisar, 2006: 56
22. Guaschino S, De Seta F. Update on *Chlamydia trachomatis*. New York Academy of Sciences. Annals. 2000; 900: 293-300

23. Kučinskienė V, Šutaitė I, Valiukevičienė S, Milašauskienė Ž, Domeika M: Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Medicina (Kaunas)*. 2006; 42(10)
24. Dereli D, Ertem E, Serter D, Yüce K. Evaluation of a direct fluorescent antibody test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *APMIS*. 1991; 99: 961-964
25. Ertem E, Dereli D, Serter D, Yüce K. Screening for *Chlamydia trachomatis* in a Turkish population. *Genitourin. Med.* 1991; 67:354
26. Ertem E, Dereli D, Serter D, Tavmergen E, Çapanoğlu R. İnfertil kadınlarda *Chlamydia trachomatis* insidansı. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 1991; 21:47
27. Çiçek C, Bilgiç A, Horasan F. A, Sertöz R. Y, Özacar T ve Taner C E, Semptomatik gebe kadınlarda *Chlamydia trachomatis*'in saptanmasında hücre kültürü yöntemi ile PACE 2 CT testinin karşılaştırılması. *Moleküler Tanı Derg*, 1, 2003; 20-24
28. Cicek C, Altuğlu I, Ozacar T, Kolday K. Demir N, ve Bilgic A. Assessment of *Chlamydia trachomatis* prevalence by cell culture and transcription mediated amplification in symptomatic women. *Med Princ Pract*, 2004;13, 91-94
29. C Çiçek, C., Bilgiç A, Yaygın YE, Koturoğlu G, Yalaz M, Kurugöl Z, Nazlı O ve Gündem G, Semptomlu hastalarda *Chlamydia trochamatis* infeksiyonunun prevalansı, *İnfeksiyon Derg.* 2006; 20 (1): 27-30
30. Genç M, Ağaçfidan A, Yeğenoğlu Y, Turan Ö, Kuru Ü, Mardh P-A. Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in pregnant Turkish women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12: 395
31. Yılmaz G, Türkoğlu S, Gerikalmaz Ö, Badur S. İstanbul'da hayat kadınlarında *Chlamydia trachomatis* infeksiyonu prevalansının enzim immunoassay (EIA) ve immunofloresan (DFA) yöntemleri ile saptanması. 6. Ulusal antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi Özet Kitabı, Antalya, 1991; 237
32. Ağaçfidan A, Badur S: İstanbul'da hayat kadınları ile cinsel ilişkide bulunan kişilerde *Chlamydia trachomatis* araştırılması ve cinsel

- davranışları yönünden değerlendirilmesi. 12. İstanbul Tıp Fakültesi Kurultayı, Özet Kitabı. İstanbul. 1993; 139
- 33.Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin. Microbiol. Rev. 1997;10: 160-184
- 34.Miller KE. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection 2006; 73(8): 1411-1416
- 35.Land JA, Evers JL. Chlamydia infection and subfertility. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2002; 16(6):901-912
- 36.Cates W Jr, Wasseheit JN. Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. Am J Obstet Gynecol. 1991; 164(6):1771-1781
- 37.Mary C. Martin, MD Rreprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite. Martin L. Pernoll, MD ed; Çağdaş Obstetrik ve Jinekolojik Teşhiz&Tedavi, Cilt II, Bölüm VI, Çevirenler: Doç. Dr. Rifat Gürsoy, Dr. Tuncay Nas. 1994;1283-1295
- 38.Mahony JB, Chernesky MA. Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 865-867
- 39.Jones RB, Katz BP, VanderPol B, Caine VA, Batteiger BE, Newhall WJ. Effect of blind passage and multiple sampling on recovery of *Chlamydia trachomatis* from urogenital specimens. J. Clin. Microbiol. 1986; 24:1029-1033
- 40.LeBar W., Herschman B., Jemal C., Pierzchala J. Comparison of DNA Probe, Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay, and cell culture for the detection of *Chlamydia trachomatis*. J. of Clin. Microbiol. 1989; 27(5):826-828
- 41.Dereli D, Ertem E, Serter D, Yuce K. Evaluation of a direct fluorescent antibody test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. A P M I S 1991; 99(10): 961-964
- 42.Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia Trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein conjugated monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1983; 17: 666-668

43. Stephens RS, C-C Kuo, MR Tam. Sensitivity of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in cell culture. J. Clin. Microbiol. 1982; 16: 4-7
44. Yoder BL, WE Stamm, CM Koester, ER Alexander. Microtest procedure for isolation of *Chlamydia Trachomatis*. J. Clin. Microbiol. 1981; 13:1036-1039
45. Kiremitçi A. Chlamydia infeksiyonlarının tanısında antijen tanı testleri. III. Ulusal Chlamydia infeksiyonu simpozyumu, Program ve Simpozyum Kitabı, Afyonkarahisar, 2006; 98-104
46. Roblin PM, Gelling M, Kutlin A, Tsumura N, Hammerschlag MR. Evaluation of a new optical immunoassay for diagnosis of neonatal chlamydia conjunctivitis. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 516-517
47. Çiçek C: *Chlamydia trachomatis* infeksiyonlarında antibiyotik duyarlılık testlerinin yeri ve direnç. III. Ulusal Chlamydia infeksiyonu simpozyumu, Program ve Simpozyum Kitabı, Afyonkarahisar, 2006; 112-117
48. Horner P. The case for further treatment studies of uncomplicated genital *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Transm Infect. 2006; 82(4):340-3
49. Miller KE. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. Am Fam Physician. 2006; 73(8): 1411-6
50. Johnson RE, Newhall WJ, Papp JR, et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. MMWR Recomm Rep 2002; 51(RR-15): 1-38
51. Hillis SD, A Nakashima, PA Marchbanks, DG Addiss, JP Davis. Risk factors for recurrent C. trachomatis infections in women. AM. J. Obstet. Gynecol. 1994; 170: 801-806
52. Watson E J, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh P, Stary A, Pederson B S. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review J Med Microbiol 2002; 51: 1021-1031
53. Miller K E. Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. Amer Fam Phys 2006; 73(8): 1411-1416

54. Orr P, Sherman E, Blanchard J, Fast M, Hammond G, Brunham R. Epidemiology of infection due to *Chlamydia trachomatis* in Manitoba, Canada. Clin. Infect. Dis. 1994; 19: 876-883
55. Quinn TC, Warfield P, Kappus E, Barbacci M, Spence M. Screening for *C. trachomatis* infection in an inner-city population: A comparison of diagnostic methods. J. Infect. Dis. 1985; 152: 419-423
56. D Taylor-Robinson, B J Thomas: Laboratory techniques for the diagnosis of chlamydial infections. Genitourin Med 1991; 67: 256-266
57. E. L. Chan, K. Brandt, G. Horsman: Evaluation of Sanofi Diagnostics Pasteur Chlamydia Microplate EIA Shortened Assay and comparison with cell culture and syva Chlamydia Microtrak II EIA in high- and low- risk populations. Jour Clin Mic 1995; 33(11): 2839-2841
58. S. J. Foulkes, R. Deighton, A. R. B. Feeney, K. C. Mohanty, W. J. Freeman: Comparison of direct immunofluorescence and cell culture for detecting *Chlamydia trachomatis*. Genitourin Med 1985; 61: 255-257
59. R. W. Peeling, A. O. Oyelese, R.C. Brunham, J. O. Ndinya Achola, A. R. Ronald. The role of the laboratory in a chlamydia control programme in a developing country. East African Medical Journal 1992; 69(9): 508-514
60. Swain Gr, McDonald RA, Pfister JR, et al. Decision analysis: point-of-care Chlamydia testing vs. laboratory-based methods. Clin Med Res. 2004; 2(1):29-35
61. Limberger RJ. et. Al. 1992. Evaluation of culture and Gen-Probe Pace 2 assay for detection *Neisseria Gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens transported to a State Health Laboratory. J Clin Microbiol 30:1162-1166
62. Centers For Disease Control And Prevention 1993. Recommendations for the prevention and management of *C. trachomatis* infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 42: RR-12
63. Skidmore S, Horner P, Mallinson H: Testing specimens for *Chlamydia trachomatis* Sex Transm Infect 2006; 82: 272-275
64. Lebar W, Herschman B, Jemal C, Pierzchala J. Comparison of DNA probe, monoclonal antibody enzyme immunoassay, and cell culture for

the detection of *Chlamydia trachomatis*. Jour of Clin Mic 1989; 27(5): 826-828

- 65.Çiçek C, Bilgiç A, Şamlıoğlu P: *Chlamydia trachomatis* prevalansına göre laboratuarda kullanılacak en uygun tanı testinin seçilmesi: Kanıta dayalı tıp yaklaşımı III. Ulusal Chlamydia infeksiyonu simpozyumu, Program ve Simpozyum Kitabı. Afyonkarahisar. 2006; 147-149