

## ATIPIK PNÖMONİ ETKENİ OLARAK CHLAMYDIA'LARIN LABORATUVAR TANISI

Ali AĞAÇFIDAN

*Laboratory diagnosis of atypical pneumonia caused by Chlamydia species.*

İnsanda infeksiyon etkeni olarak saptanan *Chlamydia* cinsinden mikroorganizmalar *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* ve *Chlamydia pneumoniae* olmak üzere üç türde toplanmıştır (17, 18). Son yıllarda hayvanlardan izole edilen *C. pecorum* dördüncü tür olarak sınıflandırmada yer almaktadır (6). Bu türler arasındaki karakteristik farklar tabloda gösterilmiştir.

Tablo. Chlamydia türlerinin karakteristik özellikleri (6).

Özellikler	Türler			
	C.pecorum	C.psittaci	C.pneumoniae	C.trachomatis (Trahom/LGV)
Doğal konaklar	Siğır, koyun	Kuşlar, bazı memeliler	İnsan	İnsan
Elementer cisim morfolojisi	Yuvarlak	Yuvarlak	Armut şeklinde	Yuvarlak
İnklüzyon morfolojisi	Oval, kesif	Değişken, kesif	Oval, kesif	Oval, vakuoler
İnklüzyonda glikojen oluşumu	-	-	-	+
Folat biyosentezi	-	-	-	+
Serovar sayısı	3	?	1	12/3
DNA'daki G+C oranı	39.3	39.6	40.3	39.8
DNA homolojisi				
C.pecorum	88-100	1-20	10	1-10
C.psittaci		14-95	1-8	1-33
C.pneumoniae			94-96	1-7
C.trachomatis				92

*Chlamydia* cinsinden mikroorganizmalar Gram negatif, hareketsiz, iki farklı yaşam siklusu gösteren hücre içi patojenlerdir. *Chlamydia*'ların konak hücreyi infekte eden şekline "elementer cisimcik", hücre içinde gelişim gösteren ve inklüzyon oluşturan yapıya ise "retiküler cisimcik" adı verilmektedir. Elementer cisimcik küçük olup boyutları yaklaşık 0.3 µm çapında, retiküler cisimcikler ise 0.8-1.2 µm çapındadırlar. Bu arada her iki yapı arasında gelişme gösteren "ara cisimcikler"e de rastlamak mümkündür.

*Chlamydia*'ların gruba özel (lipopolisakkarit) ve türe/tipe özel (major outer membrane protein: MOMP) antijenleri vardır. Bazı bakteriler ile çapraz reaksiyon oluşturan, ancak serolojik tanıyı etkilemeyen lipopolisakkarit antijenlerin komplemanı tespit edici özelliği bulunmaktadır. MOMP ise türe/tipe özgül antijenleri içermektedir (2).

*Chlamydia* cinsinden atipik pnömoni etkeni olarak sıklıkla karşılaşılan türler *C.pneumoniae* ve *C.psittaci*'dir. *C.trachomatis*'in ise 3 hafta-4 ay arasındaki çocuklarda pnömoni oluşturduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bazı durumlarda ve özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde *C.trachomatis*'in atipik pnömoni etkeni olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle atipik pnömoni etkenleri araştırılırken *Chlamydia* cinsinden her üç türün ayrı ayrı incelenmesi laboratuvar tanısı açısından önem taşımaktadır (8,9,11,14,15,19,20,21).

### **C.pneumoniae'nin tanısı**

*C.pneumoniae*'nin muayene maddelerinden izolasyonu oldukça güçtür. İzolasyon amacıyla kullanılan hücreler McCoy, Hep-2, H 292, HL, Hela 229 ve Vero hücreleridir (8,13,17). Bazı çalışmalarda HL hücrelerinin *C.pneumoniae* izolasyonunda en uygun hücre ortamını oluşturduğu bildirilmiştir (3). Bir diğer çalışmada ise Hep-2 hücrelerinin DEAE-dekstran ile muamele edilmesinin muayene maddesi ekilen bu hücrelerde *C.pneumoniae* inklüzyonlarının büyümesine neden olduğu ve tanıyı kolaylaştırdığı bildirilmiştir (17).

Ayrıca *C.pneumoniae* izolasyonunda muayene maddesinin alındığı bölgenin yeri de önem taşımaktadır. Trakea ve/veya bronşlardan alınan aspiratlı örneklerde ya da biyopsi materyalinde *C.pneumoniae*'nin izolasyon şansı, boğaz salgısından alınan örneğe göre oldukça yüksektir (8, 10, 12, 17). Boğaz sürüntü örneklerinde çok sayıda epitel hücresinin bulunması izolasyon şansını artırmaktadır. Alınan muayene maddesinin +4°C'de saklanması ve alındığı gün ekilmesi idealdir. Eğer ekim için uzun süre gerekiyorsa -70°C'de dondurularak saklanması gerekmektedir (13).

*C.pneumoniae*'nin serolojik tanısında "gold standard" olarak kabul edilen test, mikro-immünfluoresan (mikro-IF) testidir (2,5,8). Bu amaçla geliştirilmiş ticari kitler bulunmakta ya da bazı araştırma laboratuvarlarında özel olarak hazırlanmaktadır. Bu test ile türe spesifik IgM, IgG ve IgA sınıfı antikorlar saptanmaktadır. Mikro-IF testi yapılırken her üç sınıf antikorun da ayrı ayrı araştırılması gerekmekte ve bu durum enfeksiyonun klinik seyri hakkında ayrıntılı bilgi vermektedir. Genel olarak standart TW-183 suşu antijen olarak kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda ise, enfeksiyonun epidemiyolojisi göz önünde tutularak bölgesel izolatlar (örneğin, Finlandiya'da: Finlandiya K-6) antijen olarak kullanılmaktadır. Mikro-IF testinin yorumlanmasında bazı faktörlere dikkat etmek gerekir. Bunlardan biri, hastanın yaşına bağlı olarak artış gösteren, romatoid faktörün neden olduğu yalancı IgM pozitifliğidir. Bu durumu önlemek için, hasta serumunda spesifik IgM aramadan önce, IgG'nin absorblanması gerekmektedir. Hastanın enfeksiyonu ilk kez geçirip-geçirmediğinin bilinmesi, daha önce geçirilmiş bir enfeksiyon söz konusu ise nüks veya reinfeksiyon durumunun araştırılması ayrıca önem taşımaktadır. Mikro-IF antikor titresinde dört kat artış ya da 1:16 ve üzerindeki IgM mikro-IF değeri ya da 1: 512 ve üzerindeki mikro-IF IgG antikor değeri akut enfeksiyon göstergesidir. Hastalık başladıktan sonra yaklaşık 3-4 hafta içinde IgM, 6-8 hafta sonra ise IgG sınıfı antikorlar oluşmaktadır. Reinfeksiyonlarda IgM antikorları oluşmayabilir, ancak IgG titresinde yükselme saptanmaktadır (7,8).

Mikro-IF testinin uygulanmasında görev alan kişinin deneyimli olması, gerçek sonucu belirleyici diğer önemli faktördür. Bazı durumlarda non-spesifik boyanmalar kolaylıkla negatif titrelerin yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmesine sebep olabilir.

*C.pneumoniae* tanısında bugün sıklıkla başvurulan bir diğer yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Bu yöntem ile muayene maddelerinde yaklaşık  $10^{-16}$  g DNA saptanabilir ki, bu da bir *Chlamydia* elementer cisimciğine eşdeğerdir. Muayene maddesinde çok düşük sayıda bulunan genetik materyali enzim ve uygun seçilmiş primerler yardımıyla saptanabilir hale getiren PCR, hücre kültürüne alternatif olarak sunulmaktadır (4, 7).

### **C.psittaci'nin tanısı**

*C.psittaci*'nin izolasyonu oldukça güçtür. Muayene maddesinin, örneğin balgamın antibiyotik ile muamele edilerek, daha sonra materyalin farelere inoküle edilmesi ya da embriyolu yumurtanın sarı kesesine ekilmesi ile *C.psittaci* üretilmektedir. Ayrıca hücre kültürü ile izolasyon da mümkündür. Fakat bu yöntemler uygulama güçlükleri nedeni ile rutin laboratuvarında tercih edilmemektedir. *C.psittaci* infeksiyonlarının serolojik tanısında, serolojik yöntemler önemli yer tutmaktadır (15).

Tanıda genellikle mikro-IF testi kullanılmaktadır. Ayrıca kompleman birleşmesi testi seçilen bir diğer önemli yöntemdir. Hasta serumlarında saptanan 1/64 veya daha yüksek antikor titresi tanı için önem taşımaktadır. Bu titre 1/32'den az ise çoğu zaman klinik önem ifade etmemektedir (2, 19).

*C.psittaci* infeksiyonlarında serolojik tanı değerlendirilirken hastanın anamnezi ve infeksiyonun oluşmasında rezervuar rolü oynayan hayvanın hasta ile ilişkisinin bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca *C.psittaci* tanısında, etkeni muayene maddelerinde saptayan antijen tayin yöntemleri Enzim İmmünessey (EIA) ve Direkt Fluoresan Antikor (DFA) testleri de kullanılmaktadır. PCR'a *C.psittaci* tanısı için henüz sadece araştırma amacıyla başvurulmaktadır. Bu konuda elde edilen sonuçlar ümit verici olup, yapılan çalışmalar daha çok veteriner hekimlik alanında bulunmaktadır (1,15).

### **C.trachomatis'in tanısı**

*C.trachomatis* tanısında kullanılan yöntemler genel olarak ürogenital sistem infeksiyonları için geliştirilmiştir. Atipik pnömoni etkeni olarak *C.trachomatis* araştırmalarında muayene maddeleri (nazofarinksten alınan sürüntüler, bronkoalveolar lavaj sıvısı veya bu bölgelerden alınan biyopsi materyali) uygun tanı yöntemleri ile (ürogenital sistem infeksiyonlarında kullanılan testlere adapte edilerek) incelenmekte ve atipik pnömoni etkeninin *C.trachomatis* olup olmadığı araştırılmaktadır.

Atipik pnömoni etkeni olarak *C.trachomatis* tanısında kullanılan yöntemler; etkenin izolasyonu (McCoy hücre kültürü kullanılarak), DFA, EIA, seroloji (Mikro-IF) ve PCR olarak sayılabilir (2, 16, 21). *C.trachomatis* tanısı diğer türlere göre daha az komplike olduğundan çoğu zaman birçok laboratuvarında ticari kitler kullanılarak tanı konulur. Mikro-IF *Chlamydia* cinsinden her üç türe ait antijenlere karşı antikorları belirlediğinden bir hasta serumuyla aynı anda hangi etken/etkenlerle infeksiyon oluştuğunu saptamamıza imkan sağlamaktadır (2).

KAYNAKLAR

- 1- Andersen AA, Rogers DG: Characterization of Chlamydia psittaci isolates from swine, "J Orfila, GI Byrne, MA Chernesky, et al (eds): *Chlamydial Infections, Proceedings of the Eighth International Symposium on Human Chlamydial Infections*" kitabında s.578, Societa Editrice Esculapio (1994).
- 2- Barnes RC: Laboratory diagnosis of human chlamydial infections *Clin Microbiol Rev* 2: 119 (1989).
- 3- Cles LD, Stamm WE: Use of HL cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae, *J Clin Microbiol* 28: 938 (1990).
- 4- Cook PJ, Honeybourne DH: Chlamydia pneumoniae, *J Antimicrob Chemoter* 34: 859 (1994).
- 5- Dywer RSTC, Treharne JD, Jones BR, Herring J: Chlamydia infection. Results of microimmunofluorescence tests for the detection of type specific antibody in certain chlamydia infections, *Br J Vener Dis* 48:452 (1972).
- 6- Fukushi H, Hirai K: Chlamydia pecorum. The fourth species of genus Chlamydia, *Microbiol Immunol* 37: 515 (1993).
- 7- Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter J, Quinn TC: Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture and serology for detection of Chlamydia pneumoniae in symptomatic and asymptomatic patients *J Clin Microbiol* 32: 903 (1994).
- 8- Grayston JT: Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, *Chest* 95: 664 (1989).
- 9- Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J: A new Chlamydia psittaci strain called TWAR from acute respiratory tract infections, *N Engl J Med* 315: 161 (1986).
- 10- Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin M, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, Smith P, Schachter J: Persistent infection with Chlamydia pneumoniae following acute respiratory illness, *Clin Infect Dis* 14: 178 (1992).
- 11- Ito JJ, Comess KA, Alexander ER, Harrison HR, Ray CG, Kiviat J, Sobonya RE: Pneumonia due to Chlamydia trachomatis in an immunocompromised adult, *N Engl J Med* 307: 95 (1982).
- 12- Jantos C, Artelt P, Schiefer HG: Acute lower respiratory tract infection associated with Chlamydia pneumoniae in Germany, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 33 (1993).
- 13- Kuo C-C, Grayston JT: Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of Chlamydia sp. strain TWAR, *J Clin Microbiol* 26: 812 (1988).
- 14- Moncada JV, Schachter J, Wofsy C: Prevalence of Chlamydia trachomatis lung infection in patients with acquired immune deficiency syndrome, *J Clin Microbiol* 23: 986 (1986).
- 15- Oldach DW, Gaydos CA, Mundy LM, Quinn TC: Rapid diagnosis of Chlamydia psittaci pneumonia, *CID* 17: 515 (1993).
- 16- Ripa KT, Mardh P-A: Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide treated McCoy's cells, *J Clin Microbiol* 6: 328 (1977).
- 17- Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR: Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae *J Clin Microbiol* 30: 1968 (1992).
- 18- Saikku P: The epidemiology of Chlamydia pneumoniae (TWAR), "PA Mardh, P Saikku (eds): *Chlamydial Infections of the Genital and Respiratory Tracts and Allied Conditions*" kitabında s.56, Cummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä Finland (1991).
- 19- Schachter J: Chlamydial infections, *West J Med* 153: 532 (1990).
- 20- Schachter J, Grossman M, Sweet RL, Holt J, Jordon C, Bishop E: Prospective study of perinatal transmission of Chlamydia trachomatis, *JAMA* 255: 3374 (1986).
- 21- Tack KT, Rasp FL, Hanto D, Peterson PK, O'Leary M, Simmons RL, Sabath LD: Isolation of Chlamydia trachomatis from the lower respiratory tract of adult, *Lancet* i: 116 (1980).