

CHLAMYDIA İNFEKSİYONLARINDA MİKROBİYOLOJİK TANI

Ali AĞAÇFIDAN

Günümüzde *Chlamydia* infeksiyonları tıbbi yönden son derece ciddi problemlere sebep olup, kadın hastalıkları ve doğum, üroloji, veneroloji, çocuk sağlığı ve hastalıkları, göz hastalıkları, kardiyoloji, göğüs hastalıkları, romatoloji gibi birçok anabilim dalını doğrudan ya da dolaylı olarak ilgilendirmektedir(1-3,9). İnsanda infeksiyon etkeni olarak saptanan *Chlamydia* cinsinden mikroorganizmalar üç türde toplanmıştır. Bunlar *C.trachomatis*, *C.pneumoniae* ve *C.psittaci*'dir. *Chlamydia* infeksiyonları arasında *C.trachomatis* cinsel temasla bulaşan hastalıklar (CTBH) arasında önemli yer tutmakta ve özellikle batı ülkelerinde CTBH arasında en sık saptanan patojen olarak belirlenmektedir. Bu nedenle de *Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemler daha çok ürogenital *C.trachomatis* infeksiyonlarının tanısında odaklaşmış bulunmaktadır (1,2,12).

Genel olarak bakıldığında *C.trachomatis* tanısında kullanılan yöntemler sitolojik yöntemler, hücre kültürü, antijen tayin yöntemleri (EIA, direkt fluoresan antikor testi: DFA ve hızlı testler), serolojik yöntemler (indirekt fluoresan antikor testi: IFA, mikroimmün fluoresan testi: MIF ve EIA) ve moleküler biyolojik tanı testleri (hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon testleri: NAAT) şeklinde sınıflandırılabilir. Günümüzde *C.trachomatis* için kullanılan laboratuvar tanı yöntemleri *C.pneumoniae* ve *C.psittaci* için bazı farklılıklar göstermekle birlikte prensipte aynıdır (1,9).

Bu yazıda insanda infeksiyon etkeni olarak sıklıkla rastlanan *C.trachomatis* infeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemler karşılaştırmalı olarak incelenecek, ayrıca son yıllarda oldukça popüler olan (kardiyovasküler hastalıklar, artrit ve solunum yolu hastalığı gibi çeşitli klinik tablolar oluşturan) *C.pneumoniae* infeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler üzerinde durulacaktır.

Hücre kültürü yöntemi *Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında standart metod (altın standard) olarak günümüze kadar gelmiştir. Bu metod ile canlı mikroorganizmanın izolasyonu hedeflenmektedir. Hücre kültürünün 'altın standard' olabilmesi için mutlaka oluşan inklüzyonların fluoresan işaretli konjuge ile boyanması gerekmektedir. Son yıllarda moleküler tanı yöntemleri ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda hücre kültürünün duyarlılığının % 60-80 olduğu bildirilmektedir. Hücre kültürünün düzgün işleyebilmesi için muayene maddesi alındığından itibaren transportunda soğuk zincirin doğru takip edilmesi gerekmektedir (11).

Amerika ve Avrupa orjinli piyasada 20'den fazla antijen saptayan ticari kit bulunmaktadır. Bunların duyarlılıkları % 50-80 arasında değişmektedir. Bu testler genellikle tarama testi olarak kullanılmaktadır. CDC'ye göre prevalansı % 5'ten az olan gruplarda, bu tarama testleri ile pozitif çıkan örneklerin mutlaka bir doğrulama testi ile doğrulanması önerilmektedir. Özellikle antijen tayin yöntemi EIA ile yapılacaksa lipopolisakkarit antijene bağlı olarak diğer Gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyonlar oluşabilmektedir (10-12). Genital *C.trachomatis* infeksiyonlarının tanısında kullanılan temel EIA prensibine dayanan hızlı testler birçok ticari laboratuvarında klasik EIA testlerinin yerini almıştır. 15 dakika gibi kısa sürede sonuç vermesi, tek örneğin çalışılmasına imkan sağlaması ve maliyetinin düşük olması bu testleri günümüzde popüler hale getirmiştir. Temeli EIA prensiplerine dayanan

nan hızlı testler ile ilgili, sonucu olumlu ya da olumsuz çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Konu ile ilgili çalışmalarda olumsuz yorumlar daha çok testlerin düşük duyarlılığı ile ilgilidir. Ancak bazı çalışmalarda ise duyarlılık % 75'lerin üstündedir. Genel olarak bu testler değerlendirildiğinde; özellikle veneroloji kliniklerinde hasta klinik inceleme sonrası laboratuvar sonucu hemen alındığından pozitif sonuç veren olgularda tedaviye hemen başlanabileceğinden ileriki komplikasyonların önlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (1,3,13).

Bununla birlikte bir diğer antijen tanı yöntemi olan DFA testi ile de tek örnek bağımsız olarak kısa süre içinde incelenebilir. DFA testinin duyarlılığı hızlı testlerle karşılaştırıldığında çok daha yüksektir. Ancak fluoressan mikroskopu ve sonuçların yorumlanmasında deneyimli kişilere gereksinim vardır (1,13). MIF özellikle kronik *C.trachomatis* infeksiyonların tanısında kullanılmaktadır. Bu yöntem ile hasta serumlarında spesifik IgM, IgG ve IgA antikorlarını ayrı ayrı araştırmak mümkündür. Özellikle son yıllarda geliştirilmiş olan ve serotiplendirme esasına dayanan kitler ile *C.trachomatis*'e karşı oluşan antikor durumu, BDE, CHIJ, FGK ve LGV serotip komplekslerinden birine ait olup olmadıkları saptanabilmektedir (1,3,10,11).

Tanı amacıyla bakıldığında önemli olan laboratuvarında kullanılacak testin maliyetinin ucuz olması, güvenilir ve pratik özellik göstermesi, çok sayıda muayene maddesinin incelenmesine olanak sağlaması ve hızlı sonuç vermesi gibi kriterler o testin günümüzde popülaritesinin artmasında önemli rol oynamaktadır. *Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında kullanılan laboratuvarın koşulları bir merkezden diğerine farklılık göstermektedir. Her laboratuvar ayrı ayrı değerlendirildiğinde; örneğin rutin hizmet veren sınırlı imkanları olan bir laboratuvardan çok geniş boyutta bir referans laboratuvarına kadar değişik imkanları olan merkezlerde seçilen test, maddi imkanlar ölçüsünde belirlenmekte; böylece seçilen tanı yönteminin özelliği her laboratuvarında başka bir tanı yöntemini ön plana getirmektedir. Bugün bir laboratuvarında tarama ve/veya doğrulama testi için başvuru olan yöntem bir diğer yerde tam tersi yönünde işlem görmektedir (1,3,10,11).

Moleküler tanı yöntemleri arasında büyük paya sahip olan NAAT'lerinin standardizasyon sorunu günümüzde önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (2,6,7,9,10). Bu amaçla standardizasyon sorunu hemen hemen çözülmüş sayılabilen ticari kitler nedeniyle bugün için NAAT'ler referans yöntem olarak düşünülebilmektedir. Bugün ticari olarak hazırlanmış ve birçok referans laboratuvarında kullanılan NAAT'leri başlıca üç grupta toplamak mümkündür. Bu testler polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction; PCR, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), ligaz zincir reaksiyonu (ligase chain reaction; LCR, Abbott laboratories, Abbott Park, IL) ve transkripsiyon esaslı amplifikasyon (transcription mediated amplification; TMA Gene Probe, Inc. La Jolla CA)'dur.

PCR (2,3,10,11)

Muayene maddelerinde çok sınırlı sayıda bulunan *Chlamydia* DNA'sını primer ve enzimler yardımıyla arttırılarak saptanabilir hale getirmektedir. Bu test diğer NAAT'lere göre inhibitör etkenlerden en fazla oranda etkilenen test olarak karşımıza çıkmaktadır.

PCR'da *C.trachomatis* için geliştirilmiş primer setleri aşağıdaki gen dizilerini hedeflemiştir:

- a) Major dış membran proteini (Major outer membrane protein)
- b) 16S RNA
- c) Endojen plasmid.

Belirtilen primer setleri kullanılarak *Chlamydia* infeksiyonlarının laboratuvar tanısında PCR tekniği ile önemli gelişmeler sağlanmıştır. *Chlamydia* türleri arasında ürogenital

sistem infeksiyonlarından sorumlu *C.trachomatis*'in PCR tekniği ile belirlenmesi en çok araştırılan konulardan biri olmuştur

Tamıda kullanılan PCR tekniği belirli merkezlerde araştırma amacıyla klasik yöntemlerle "home brew" ya da ticari Amplicor™ PCR kiti kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Klasik PCR'da DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi gibi yöntemler her laboratuvarın kendi olanakları ve seçtikleri metod doğrultusunda uygulanmaktadır.

Roche Diagnostics Systems tarafından geliştirilen ticari Amplicor™ PCR kiti üretral, servikal ve idrar örneklerinin incelenmesine imkan sağlamıştır. Plasmide spesifik primerler kullanıldığı bu kit ile elde edilen sonuçlar oldukça tatminkardır. Bu kit ile muayene maddelerinde DNA ekstraksiyonunu takiben uygun primer çifti ile amplifikasyon yapılmakta, sonuçlar mikrotitrasyon plaklarında kolorimetrik yöntemle değerlendirilmektedir. Amplifikasyon sırasında timin yerine urasil kullanımı ve daha sonra oluşan bağların urasil-N glikozilaz enzimi ile harap edilmesi bir önceki PCR ürünleri ile oluşabilecek kontaminasyonun önlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Amplicor™ PCR kiti ile üretral örneklerde başarılı sonuçlar elde edilmesi, ancak servikal örneklerde istenilen sonucun alınmaması muayene maddelerinde *C.trachomatis* için, PCR pozitifliğini inhibe eden birtakım faktörlerin bulunduğunu düşündürmektedir. Amplicor™ PCR kitinde, kullanım kolaylığı nedeni ile basitleştirilen ekstraksiyon işleminin servikal örnekler için bir dezavantaj oluşturabileceği bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Özellikle klasik PCR'da komplike ekstraksiyon işlemlerinin uygulanması, servikal örneklerde elde edilebilecek yalancı negatif sonuçların alınmasını ortadan kaldırmaktadır. Bazı araştırmacılar inhibisyon durumunu önleyebilmek için alınan örnekleri 37°C'de bir gece bekletmekte ya da dondurup çözme yöntemini tercih etmektedirler.

Her ne kadar inhibitör etkenlerden kaynaklanan özellikler PCR testinde olumsuz özellik olarak düşünülmeyle birlikte hücre kültürü ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalar PCR testini yine de ön plana geçirmektedir. Özellikle "home brew PCR"lardan kaynaklanan standardizasyon sorunları göz önünde tutulduğunda Roche PCR testi alternatif tanı yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır

LCR (3,10,11)

NAAT'ler arasında yer alan LCR tekniği PCR tekniğine benzerlik göstermekte ve başlıca üç aşamada gerçekleşmektedir. LCR'in ilk aşamasında hedef *Chlamydia* DNA bölgesi işaretli problar ile karıştırılarak 94°C'de ısıtılmakta ve çift sarmallı DNA'nın tek sarmalla ayrılması sağlanmakta, daha sonra karışım 40-70°C'ye kadar soğutulmakta ve problemlerin hedef DNA'ya bağlanması işlemi gerçekleştirilmektedir.

LCR tekniğinde problar birbirlerine çok yakın ve sadece bir ya da iki nükleotid boşluk kalacak şekilde hedefe bağlanmaktadır. Daha sonra iki prob arasındaki bir ya da iki nükleotidlik boşluk polimeraz enzimi ile doldurulmakta ve bu işlemi takiben problar kovalent olarak birbirlerine bağlanmakta ve hedefi tamamlayıcı baz dizilerinden oluşan bir amplifikasyon ürünü meydana gelmektedir. Oluşan bu amplifikasyon ürünü ve ligaz ile birleştirilmiş molekül daha sonraki amplifikasyon aşamalarında hedef durumuna geçmektedir. Bu aşamalar tekrarlanarak ligasyon ürünü miktarı logaritmik olarak artmaktadır.

LCR'da amplifikasyon sonrası analiz genelde mikropartikül enzim immünoassay tekniği kullanılarak yapılmaktadır. Amplifikasyonda kullanılan dört probdan ikisi 3' ucundan biotin gibi aynı haptene ile işaretlenirken diğer iki prob 5' ucundan başka bir haptene ile işaretlenmekte ve elektroforez işlemine gerek kalmadan amplifikasyon ürünü analiz edilmektedir.

LCR, NAAT'leri arasında *C. trachomatis* tanısında en duyarlı yöntem olarak bulunmaktadır. Hasta kapasitesi yüksek laboratuvarlarda klinik örneklerin incelenmesinde pratikliği yönünden en iyi test olarak karşımıza çıkmaktadır.

TMA (8,10,11).

C.trachomatis infeksiyonlarının tanısında kullanılan amplifikasyon tekniklerinden bir diğeri olan bu yöntem temelde üç aşamalı bir tekniktir. Bunlar sırasıyla örneğin hazırlanması, hedefin amplifikasyonu ve hedefin tanısı aşamalarıdır. Örneğin hazırlanması aşamasında hedef rRNA hücrelerden serbestleşmektedir. Hedefin amplifikasyonu ise primerler, revers transkriptaz ve amplifiye edilecek RNA'nın transkripsiyon işlemini başlatan RNA polimeraz enziminin eklenmesi ile başlamaktadır. Bu işlem ile iki saat gibi kısa bir sürede hedef rRNA'nın milyonlarca kopyası yapılabilmektedir. Bu işlemin üçüncü aşamasında ise akridinimum esteri ile işaretli DNA problemleri kullanılarak hibridizasyon koruma deneyi (HPA; Hybridization protection assay) ile amplifikasyon ürününün tanısı gerçekleştirilmektedir. HPA homojen bir tanı sistemi olup hibridize olmuş problemleri hibridize olmamış problemlerden lüminometre yardımı ile ayırabilmektedir.

Ayrıca yukarıda belirtilen bu sistemlerin dışında son yıllarda hibridizasyon sonrası amplifikasyonu içeren Digene HC CT-ID ve Becton Dickinson BD Probe Tec ET System (Strand displacement amplification; SDA) ticari moleküler tanı kitleri *C.trachomatis* infeksiyonlarının tanısında kullanılmaktadır (11).

C.pneumoniae tanısı

C.pneumoniae infeksiyonların tanısında kullanılan testlerin sayısı "*C.trachomatis*" ile karşılaştırıldığında sınırlı kalmaktadır. Tanıda genellikle alternatif test bulunmamakta, en duyarlı ve güvenilir yöntem olan MIF testi, halen geçerli tek test olarak kullanılmaktadır.

Hücre kültürü ve PCR "*C.pneumoniae*" tanısında başvurulan yöntemler arasındadır. Özellikle canlı mikroorganizmanın izolasyonu hücre kültürünü 'altın standard' olarak tanıda düşündürebilmektedir. Ancak çoğu zaman rutin laboratuvarlarda hücre kültürü ile klinik örneklerde negatif sonuç elde edilmesi günümüzde bu testi seçim dışı bırakmaktadır. Tanıda PCR ve diğer NAAT'lerin kullanılması ise pozitif durumlarda sadece infeksiyonun erken dönemini saptamakta, ayrıca geç ve kronik dönemleri hakkında da bizi aydınlatabilmektedir. Bu testler sadece çok az sayıdaki ya da ölü *C.pneumoniae*'nin saptanmasına imkan tanımamakta, ayrıca hücre kültürü için uygun olmayan muayene maddelerinden de etkenin saptanmasına olanak tanımaktadır. PCR ile solunum örneklerinden vasküler dokularda ve perifer mononükleer kan hücrelerinde *C.pneumoniae* saptamak mümkündür. Ancak gerek PCR'da, gerekse diğer NAAT'inde en önemli sorun testin optimizasyonu ve standardizasyonudur. Ayrıca muayene maddelerinde birtakım inhibitörlerin bulunması bu testlerin olumsuz özelliklerindedir (3-5).

MIF testinde *C.pneumoniae* elementer cisimcikleri antijen olarak kullanılmakta, bunlara karşı hasta serumunda IgM, IgG ve IgA sınıfı spesifik antikorlar araştırılmaktadır. Tanıda spesifik IgM antikorlarının gösterilmesi (1/16 veya daha yüksek titre) ya da IgG düzeylerinde görülen dört katlık artış anlamlı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca 1/512 veya daha yüksek titrede bir defa saptanan pozitiflik aktif infeksiyonun göstergesi olarak düşünülmektedir. Her üç antikorun ayrı ayrı araştırılarak yorumlanması, tanıda akut ve kronik infeksiyonların belirlenmesinde önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Barnes RC: Laboratory diagnosis of human chlamydial infections, *Clin Microbiol Rev* 2:119 (1986).
- 2- Bauwens JE, Clark AM, Stamm WE: Diagnosis of Chlamydia trachomatis endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay, *J Clin Microbiol* 31:3023 (1993).
- 3- Black CM: Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections, *Clin Microbiol Rev* 10:160 (1997).
- 4- Boman J: Diagnosis of Chlamydia pneumoniae infections, "Saikku P (ed): *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*" s. 65, Helsinki (2000).
- 5- Grayston JT: Chlamydia pneumoniae, strain TWAR pneumonia, *Annu Rev Med* 43:317 (1992).
- 6- Gençay M, Ağaçfıdan A: Cinsel temasla bulaşan hastalıkların tanısında kullanılan moleküler yöntemler, "Ağaçfıdan A, Ağı Ö (eds): "*Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıklar*" kitabında s. 431, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul (1999).
- 7- Ossewaarde JM, van Doornum GJ, Buimer M, Choueiri B, Sary A: Differences in sensitivity of the Amplicor chlamydia trachomatis PCR assay, *Genitourin Med* 73:207 (1997).
- 8- Pasternack R, Vuorinen P, Miettinen A: Evaluation of the gen-probe Chlamydia trachomatis transcription-mediated amplification assay with urine specimens from women, *J Clin Microbiol* 35:676 (1997).
- 9- Schachter J: Chlamydial infections, *West J Med* 153:523 (1990).
- 10- Schachter J: Diagnosis of human Chlamydial infections, "Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al (eds): *Proceedings of the International Symposium on Human Chlamydial Infection*" s. 577, San Francisco (1999).
- 11- Sary A: Diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infections, "Saikku P (ed): *Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydia Research*" s. 61, Helsinki (2000).
- 12- Taylor-Robinson D: Tests for infection with Chlamydia trachomatis, *Intern J STD AIDS* 7:19 (1996).
- 13- Wooley PD, Pumphery J: Application of 'Clearview Chlamydia' for the rapid detection of cervical chlamydial antigen, *Intern J STD AIDS* 8:257 (1997).