

**KLİNİK ÖRNEKLERDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE CHLAMYDIA
TRACHOMATIS ARAŞTIRILMASI***
**The Investigation of Chlamydia Trachomatis in Clinical Samples
with Molecular Methods**

Osman ÖZÜBERK¹, Selma GÖKAHMETOĞLU²

Özet: *Chlamydia trachomatis*, tüm dünyada en yaygın seksüel geçişli bakteriyel enfeksiyon ajanı olarak bilinir. Bu mikroorganizma zorunlu hücre içi parazittir. *C.trachomatis*, trahom gibi göz enfeksiyonlarına, yenidoğanlarda pnömonilere, genitoüriner sistem enfeksiyonlarına ve Lenfogradüloz venerum (LGV) suşları tarafından oluşturulan ve özellikle genital bölgedeki lenf düğümlerinde patoloji ile karakterize LGV'a neden olmaktadır. Bu çalışmada klinik örneklerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Gerçek Zamanlı PCR ile *C. trachomatis*'in araştırılması amaçlandı.ubat 2010-Mart 2010 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doçum poliklinikleri ile Üroloji polikliniklerine genital akıntı ön tanısıyla başvuran ve genital enfeksiyon düşünülen 50 hastadan alınan sürüntü örnekleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan 50 sürüntü örneğinin 1'inde (%2) her iki yöntem ile *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu. Sonuç olarak *C. trachomatis* DNA araştırılmasında iki PCR yöntemi arasında fark bulunamadı.

Anahtar kelimeler: *C. trachomatis*, PCR, Gerçek Zamanlı PCR.

Abstract: *Chlamydia trachomatis* is known as the most common bacterial infection agent to pass with sexual transition. This microorganism is an obligatory intracellular parasite. *C. trachomatis* causes eye infections such as trachoma, pneumonias in newborn babies, genitourinary system infections and Lymphogranuloma venereum (LGV) that is constituted by LGV strains causes pathology in the lymph nodes in the genital region. In this study, it has been aimed to investigate *C. trachomatis* by using polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR methods. The swab samples that have been taken from 50 patients, who have applied to Erciyes University Gevher Nesibe Investigation and Application Hospital Obstetric and Gynecology Polyclinics and Urology Polyclinics with genital flow pre-diagnosis between February 2010 and March 2010 dates, have been included in this study. *C. trachomatis* was found positive in 1 (2%) sample of 50 samples. As a conclusion no difference was found between two PCR methods for investigation of *C. trachomatis* DNA.

Keywords: *C. trachomatis*, PCR, Real Time PCR.

¹ Bilim Uzmanı, Erciyes Ün. Sa. Bil. Ens. Mikrobiyoloji AD, Kayseri

² Prof. Dr. Erciyes Ün. Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 10.01.2012 Kabul Tarihi : 08.07.2013

* Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-09-707 nolu proje ile doktora tezi olarak desteklenmiştir.

Chlamydia trachomatis, tüm dünyada en yaygın seksüel geçişli bakteriyel enfeksiyon ajanı olarak bilinir (1). Bu mikroorganizma zorunlu hücre içi parazittir (2). *C.trachomatis*, trahom gibi göz enfeksiyonlarına, yenidoğanlarda pnömonilere, genitouriner sistem enfeksiyonlarına ve Lenfogranülo-ma venerum (LGV) suşları tarafından oluşturulan ve özellikle genital bölgedeki lenf düğümlerinde patoloji ile karakterize LGV'ye neden olmaktadır (3).

Chlamydia trachomatis 15 serotipe ayrılır; A, B, B_a ve C tipleri, D'den K'ya kadar olan tipleri, L₁, L₂ ve L₃ tipleridir. A, B, B_a ve C tipleri; konjunktival ve korneal skarlarla mayla körlüğe yol açabilen kronik keratokonjunktivite (trahom) sebep olur, genellikle ikinci bir bakteriyel enfeksiyonla birlikte bulunur, neonatal pnömoniye yol açabilir. D'den K'ya kadar olan tipleri, erkeklerde gonokokal olmayan üretrit; kadınlarda üretrit, servisit, salpenjit ve pelvik enflamatuvar hastalığa; enfekte doğum kanalından geçen bebeklerde kendiliğinden geçen inklüzyon konjunktivitine ve neonatal pnömoniye sebep olabilir. L₁, L₂ ve L₃ tipleri; süperatif inguinal adenitle karakterize LGV adı verilen ve cinsel yolla bulaşan bir hastalığa yol açar (4).

Chlamydia trachomatis'in kesin tanısı, kültür ve izolasyon, antijen ve antikorların araştırılması yöntemleri (doğrudan floresans tekniği ve enzimli immün deneyler), hibridizasyon veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) esasına dayanan testlerle yapılmaktadır (5). Ayrıca klinik örnek preparatları %5'lik iyot eriyiğiyle veya Giemsa yöntemiyle boyanarak hücre içi inklüzyon cisimcikleri araştırılabilir (6).

Bu çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerde PCR ve Real Time PCR yöntemleri uygulanarak *C.trachomatis* DNA'sının araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

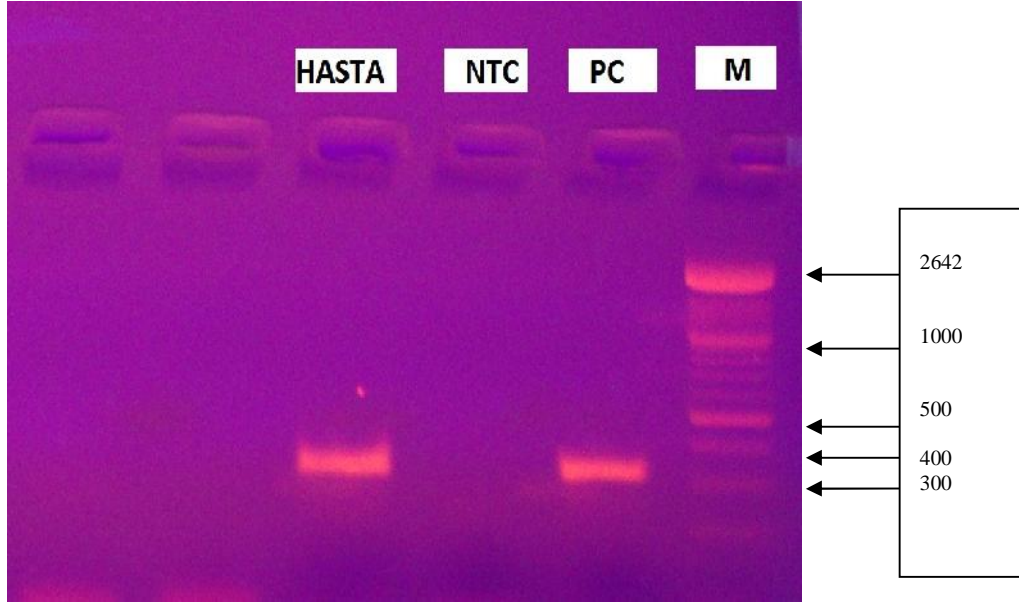
Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında yapıldı.ubat 2010-Mart 2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum poliklinikleri ile Üroloji polikliniklerine genital akıntı ön tanısıyla başvuran ve genital enfeksiyon düşünülen 50 hastadan alınan sürüntü örnekleri çalışmaya dahil edildi. Genital akıntı ön tanı hastaların herbirinden steril plastik saplı dakron eküvyon ile üretral veya servikal sürüntü örnekleri alındı. Sürüntü örnekleri *Chlamydia trachomatis* için özel taşıma besiyerine (Vircell, Spain) koyularak -70°C'de saklandı.

Bütün örneklerde nükleik asit izolasyonu QIAamp DNA Mini Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak test kitin prosedürüne uygun olarak çalışıldı. PCR yöntemi için *Chlamydia trachomatis*-DNA amplifikasyonu *Chlamydia Trachomatis* 330/740 IC (Sacace, İtalya) kiti ile termal cycler cihazında (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems) gerçekleştirildi. PCR ürünleri jel (%2 agaroz) elektroforezi ile değerlendirildi. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Jelde 330 baz eşleşme (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant veren örnekler pozitif olarak kabul edildi. Real time PCR yöntemi için Artus Qiagen *C. trachomatis* (Qiagen, Hilden, Almanya) kiti ile real time PCR cihazında (Rotor Gene Q, Qiagen) amplifikasyon gerçekleştirildi. Sonuçlar cihazda gözlenen standart eğriye göre değerlendirildi.

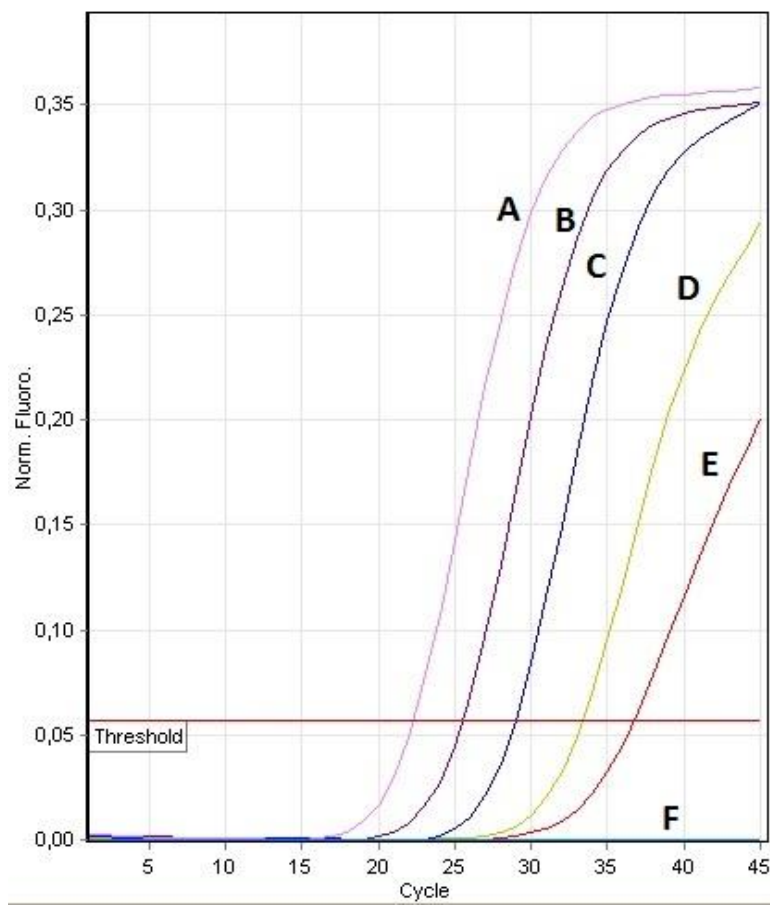
BULGULAR

PCR yöntemi ile çalışılan toplam 50 sürüntü örneğinin 1'inde (%2) *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu (ekil 1).

Real time PCR yöntemi ile çalışılan toplam 50 sürüntü örneğinin 1'inde (%2) *C. trachomatis*-DNA pozitif bulundu (ekil 2). Her iki yöntemle pozitif bulunan bu örnek üretral sürüntü idi.



ekil 1. Jel elektroforez sisteminde *C. trachomatis*-DNA incelenmesi
[NTC: Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol, M: Marker (100 bp)]



ekil 2. Real time PCR yönteminde *C. trachomatis*-DNA grafiklerinin incelenmesi (A: Standart 1, B: Standart 2, C: Standart 3, D: Standart 4, E: Hasta, F: Negatif Kontrol)

TARTI MA

Günümüzde cinsel temasla bula an hastalıklardan en yaygın olanı *C.trachomatis* ile oluşan enfeksiyonlardır. Dünya üzerinde her yıl 50 milyon yeni *C.trachomatis* enfeksiyonu olgusu gelisti sanılmaktadır. Tek başına bu rakam bile bu enfeksiyonun ne denli büyük bir sorun olduğunu ortaya koyabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 4 milyon yeni *C.trachomatis* enfeksiyonu olduğu ve etkenin görülme oranının cinsel aktif kadın popülasyonunda %10, cinsel hastalıklar kliniğine başvuran hasta popülasyonunda ise %25-40 olduğu bildirilmektedir. Enfekte annelerden doğan bebeklerde bu enfeksiyona yakalanma oranı yaklaşık %

65'tir (7,8). Kanada'da yapılan geniş kapsamlı epidemiyolojik bir çalışmada Manitoba'da pelvik inflamatuvar hastalık ve ektopik gebelik nedeni ile kliniğe başvuran kadınların yaklaşık %74'ünde *C.trachomatis* etken olarak bulunmuştur (9).

Cheng ve ark. (10) 1138 asemptomatik erkeklerin üretral sürüntülerinde PCR, ligase chain reaction (LCR) ve hücre kültürü yöntemleriyle *Chlamydia trachomatis*'i araştırmışlardır; LCR, PCR yöntemlerinin hücre kültürüne kıyasla daha duyarlı olduğunu ancak üç yöntemin özgüllüğünün birbirine benzer olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada 800 idrar (607 kadın ve 193 erkek) ve 926 sürüntü örneğinde transcription mediated amplifi-

cation (TMA) ve hücre kültürü yöntemleri ile *C. trachomatis* varlığı ara tırılmı ve idrar örneklerinde TMA yönteminin duyarlılığı %91.2 ve özgüllüğü %99.6 olarak saptanırken aynı yöntemle sürüntü örneklerinde duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulunmu tur. Aynı çalışmada, hücre kültürünün duyarlılığı idrar örneklerinde %77.2, özgüllüğü %99.5; sürüntü örneklerinde ise duyarlılığı %71.8 ve özgüllüğü %100 olarak bildirilmektedir (11).

Olafsson ve ark. (12) yüksek risk grubunda yer alan 203 kadında serviksten alınan sürüntü örneklerinde McCoy hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle, aynı hastaların idrar örneklerinde ise PCR yöntemiyle *C. trachomatis*'i ara tırmı lardır. Servikal sürüntü örneklerinin 34'ünü hücre kültürü yöntemiyle, 38'ini PCR yöntemiyle; idrar örneklerinin 37'sini PCR yöntemiyle *C. trachomatis* yönünden pozitif bulmu lardır. Servikal sürüntü örneklerinde sırasıyla hücre kültürü ve PCR yöntemlerinin duyarlılığı %87 ve %92 olarak; idrar örneklerinde PCR yönteminin duyarlılığı %95 olarak bildirilmektedir. Yapılan başka bir çalışmada genleşen kadınlarında Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ve PCR yöntemleriyle *C. trachomatis* ara tırılmı ve PCR testinin duyarlılığı %57.9, özgüllüğü ise %61.2 olarak bulunmu tur (13).

Goessens ve ark. (14) farklı moleküler metodlar (TMA, LCR ve PCR) uygulayarak ilk akım idrarı örneklerinde *C. trachomatis* varlığını ara tırmı lar, tüm yöntemlerle özgüllüğün %99'dan fazla ve *C. trachomatis* prevalansını %7.7 olarak bildirmektedir. Yapılan başka bir çalışmada ara tırmacılar PCR ve LCR yöntemlerini kültür yöntemiyle karşılaştırmı lar; PCR ve LCR yöntemlerinin daha duyarlı oldukları kanısına varmışlardır (15). Bu çalışmada kriptik plazmid gen bölgesinin hedef alındığı PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin ikisinde de aynı örnekte *C. trachomatis* DNA pozitif bulundu.

Sonuç olarak *C. trachomatis* DNA ara tırılmasında iki PCR yöntemi arasında fark bulunamadı.

KAYNAKLAR

1. Gates W, Wasseheit JN. Genital chlamydia

infections: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1771.

2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barı Yayınları Fakülteler Kitapevi, zmir, 1990.
3. Tosun , anluda T, Akçalı S, et al. Reaktif artritli hastalarda *Chlamydia trachomatis*' in ara tırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2005; 35: 25-30.
4. Öztürk M, Selçukbiricik S. Mikrobiyoloji ve immunoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, stanbul, 2000; p: 88-90.
5. Serter D. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, zmir, 1997; 21: 193-198.
6. Serter D. Mikrobiyoloji. Saray Tıp Kitabevleri, zmir, 1992; 15: 169-172.
7. Hills SD, A Nakasima PA, Machbanks DG, et al. Risk factors for recurrent *C.trachomatis* infections in women. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 801-806.
8. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eucaryotic host cell. *Cell* 1992; 89:881-889.
9. Orr P, Sherman E, Blanchard J, et al. Epidemiology of infection due to *Chlamydia trachomatis* in Manitoba. Canada, *Clin Infect Dis* 1994; 19: 876-883.
10. Cheng H, Macaluso M, Vermund SH, et al. Relative accuracy of nucleic acid amplification test and culture in detecting *Chlamydia* in asymptomatic Men. *J Clin Mic* 2001;3927-3937.
11. Ferrero DV, Meyers HN, Schultz DE, et al. Performance of the Gen-Probe AMPLIFIED *Chlamydia trachomatis* assay in detecting

- Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women and urethral and urine specimens from men attending Sexually Transmitted Disease and Family Planning Clinics. *J Clin Microbiol* 1998; 3230-3233.
12. Olafsson JH, Davidsson S, Karlsson SM, et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in high-risk females with PCR on first void urine. *Acta Derm Venereol* 1996; 76: 226-227.
 13. Germain M, Alary M, Guedeme A, et al. Evaluation of a screening algorithm for the diagnosis of genital infections with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* among female sexworkers in Benin. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 109-115.
 14. Goessens WH, Mouton JW, van der Meijden WI, et al. Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx and COBAS AMPLICOR, for detection of *Chlamydia trachomatis* in first void urine. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2628-2633.
 15. Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, et al. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 4489-4493.