

TC.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**STERİL PİYÜRİLİ HASTALARDA *MYCOPLASMA*
HOMINIS, *MYCOPLASMA GENITALIUM*, *UREAPLASMA*
UREALYTICUM, *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*,
NEISSERIA GONORRHOEAE VE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS'İN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İLE SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Serpil Semiha ÇUĞLAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ A.D.**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Barış OTLU**

MALATYA-2014

TC.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**STERİL PİYÜRİLİ HASTALARDA *MYCOPLASMA*
HOMINIS, *MYCOPLASMA GENITALIUM*, *UREAPLASMA*
UREALYTICUM, *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*,
NEISSERIA GONORRHOEAE VE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS'İN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İLE SAPTANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serpil Semiha ÇUĞLAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ A.D.

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Barış OTLU

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2013/86 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2014

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi de dahil olmak üzere, buradaki eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Barış OTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince, gelişmeye olan katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım Prof.Dr.İbrahim Halil ÖZEROL, Prof.Dr.Mehmet Sait TEKEREKOĞLU, Prof.Dr.Selma AY, Prof.Dr.Çiğdem KUZUCU ve Doç.Dr.Yusuf YAKUPOĞULLARI'na,

Tezime verdikleri maddi destekten dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde büyük emeği olan, her konuda yanımda olan ve en zor günlerimde bana sabredebilen anne ve babama, tanıştığımız ilk günden bu güne asistanlık eğitimimi ve tez çalışmalarımı büyük bir sabırla destekleyen eşim Dr. Bilal ÇUĞLAN'a ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim ÜNALDI ve ÇUĞLAN ailelerinin tüm fertlerine sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak varlığıyla bana güç katan kızım Elif İpek ve oğlum Ahmet Mete'ye, küçük elleri ve sıcaklıkları ile verdikleri destekten dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikoplazmalar.....	3
2.1.1. Mikoplazmaların Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.1.2. Mikoplazmaların Sınıflandırılması.....	5
2.1.3. Mikoplazmaların Üreme Özellikleri.....	6
2.1.4. Mikoplazmaların Antijenik Özellikleri.....	7
2.1.5. Mikoplazmaların Epidemiyolojisi.....	8
2.1.6. Örnek Toplanması.....	9
2.1.7. Mikoplazmaların Laboratuvar Tanısı.....	10
2.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> ve <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	12
2.2.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	12
2.2.1.1. <i>C. trachomatis</i> ‘in Mikrobiyolojik Özellikleri.....	13
2.2.1.2. <i>C. trachomatis</i> ’in Yaşam Döngüsü.....	14
2.2.1.3. Klamidyaların Sınıflandırılması.....	15
2.2.1.4. <i>C. trachomatis</i> ’in Antijenik Özellikleri.....	16
2.2.1.5. <i>C. trachomatis</i> ’in Epidemiyolojisi.....	17
2.2.1.6. Örnek Toplanması.....	18
2.2.1.7. <i>C. trachomatis</i> Laboratuvar Tanısı.....	19
2.2.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21
2.2.2.1. <i>N. gonorrhoeae</i> ’nin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	22
2.2.2.2. Antijenik Özellikleri.....	23
2.2.2.3. <i>N. gonorrhoeae</i> ’nin Epidemiyolojisi.....	24
2.2.2.4. Örnek Toplanması.....	25

2.2.2.5. <i>N. gonorrhoeae</i> 'nin Laboratuvar Tanısı.....	26
2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
2.3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Mikrobiyolojik Özellikleri.....	28
2.3.2. Mikobakterilerin Sınıflandırılması.....	29
2.3.4. Antijenik Özellikleri.....	29
2.3.5. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	30
2.3.6. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı.....	32
2.3.6.1. Mikroskopik İnceleme.....	32
2.3.6.2. Kültür.....	33
2.3.6.3. Serolojik Tanı.....	34
2.3.6.4. Moleküler Yöntemler.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereçler.....	37
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Örneklerin alınması, çalışma için hazırlanması ve saklanması.....	38
3.2.2. Steril piyüri tespiti.....	38
3.2.3. DNA izolasyonu.....	40
3.2.4. Multipleks PZR kiti.....	40
3.2.5. Amplifikasyon aşaması.....	41
3.2.6. Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi.....	42
3.2.7. Sonuçların yorumlanması.....	45
3.2.8. Tüberküloz 'In-House' PZR Yöntemi.....	46
3.2.8.1. Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi.....	47
3.2.9. Sonuçların değerlendirilmesi.....	47
4. BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. ÖZET.....	69
8. ABSTRACT.....	71
KAYNAKLAR.....	73

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: <i>Mollicutes</i> sınıfına ait dört takım ve özellikleri.....	6
Tablo 2. Kullanılan kitin termal döngü cihazı protokolü.....	41
Tablo 3. Çalışmamızda kullanılan multipleks PZR kiti ile saptanabilen ajanların agaroza jeldeki büyüklükleri.....	45
Tablo 4. Agaroza jel sonuç değerlendirme protokolü.....	45
Tablo 5. Termal döngü cihazında kullanılacak amplifikasyon protokolü.....	46
Tablo 6. Sonuçların aylara ve cinsiyete göre dağılımı.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Thoma lamı sayım alanı.....	39
Şekil 2. Jel elektroforez görüntüsü.....	42
Şekil 3. Jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4. Jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 5. Jel elektroforez görüntüsü.....	44
Şekil 6. Jel elektroforez görüntüsü.....	44
Şekil 7. Aylara göre steril piyüri oranları.....	49
Şekil 8. Tespit edilen mikroorganizmaların saptanma oranları.....	41
Şekil 9. Erkek popülasyonda tespit edilen etkenler	52
Şekil 10. Kadın popülasyonda tespit edilen etkenler.....	52
Şekil 11. Aylara göre pozitiflik saptanma dağılımı.....	53
Şekil 12. Mevsimlere göre mevcut mikroorganizmaların dağılımı.....	54

KISALTMALAR

HPF	: High power field (Yüksek büyütmede alan incelemesi)
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
Bç	: Baz çifti
Kb	: Kilobaz
T	: Timin
A	: Adenin
G	: Guanin
C	: Sitozin
Vaa	: Variable adherence-associated (aderans ilişkili değişken)
NGU	: Non-gonokoksik üretrit
NCNGU	: Non-klamidyal non-gonokoksik üretrit
LAMP	: Lipid associated membrane protein (lipid ilişkili membran proteini)
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay (Enzim bağlı immünosorbent deney)
PİH	: Pelvik inflamatuvar hastalık
LGV	: Lenfogranüloma venereum
EC	: Elementer cisimcik
RC	: Retiküler cisimcik
MOMP	: Major outer membrane protein (majör dış membran proteini)
LPS	: Lipopolisakkarit
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
OMP	: Outer membrane protein (dış membran proteini)
HSP	: Heat shock protein (ısı-şok proteini)
DFA	: Direkt floresan antikor
EIA	: Enzim immunoassay
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve ilaç kurulu)

LZR	: Ligaz zincir reaksiyonu
TMA	: Transcription mediated amplification (transkripsiyon aracılı amplifikasyon)
NASBA	: Nucleic acid sequence-based amplification (Dizilim bazlı nükleik asit amplifikasyonu)
β	: Beta
LOS	: Lipooligosakkarit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Rmp	: Reduction modifiable protein (Redüksiyon ile değiştirilebilir protein)
ARB	: Aside rezistan bakteri
MOTT	: <i>Mycobacteria</i> other than <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OT	: Old tüberkülin
PPD	: Pürifiye protein derivesi
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
DGTS	: Doğrudan gözetimli tedavi stratejisi
ÇİD-TB	: Çoklu ilaca dirençli tüberküloz
AIDS	: Acquired immun deficiency syndrome (Kazanılmış immün yetmezlik sendromu)
HIV	: Human immunodeficiency virus (insan immün yetmezlik virüsü)
G	: Merkezkaç kuvveti
NALC	: N-asetil L-sistein
NaOH	: Sodyum hidroksit
UV	: Ultra viyole
EMB	: Eozin metilen blue
SF	: Seyreltme faktörü
BCG	: Bacillus Calmette - Guérin
TU	: Tüberkülin ünitesi
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
CDC	: Centers for disease control and prevention
μl	: Mikrolitre
mM	: Milimol

pmol	: Pikomol
U	: Ünite
mm³	: Milimetreküp
M	: Markır
IC	: İnternal kontrol
TV	: <i>Trichomonas vaginalis</i>
MH	: <i>Mycoplasma hominis</i>
MG	: <i>Mycoplasma genitalium</i>
CT	: <i>Chlamydia trachomatis</i>
NG	: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
UU	: <i>Ureaplasma urealyticum</i>
NK	: Negatif kontrol
PK	: Pozitif kontrol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üriner sistem infeksiyonları toplumun genelini ilgilendiren, sebep olduğu sekeller ile sistitten ürosepsise kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilen ciddi enfeksiyonlardır. Bu infeksiyonlar toplum kökenli olabileceği gibi hastane kökenli de olabilir. Hem toplum kökenli hem de hastane kökenli infeksiyonlarda en sık izole edilen etken *Escherichia coli* (%50-%90) 'dir. Görülme sıklığı bakımından *E. coli*' yi *Enterobacteriaceae* üyelerinden *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. takip eder (1). Bununla birlikte yavaş üreyen ya da kültürde üretilmesi zor mikroorganizmalar için rutin mikrobiyolojik yöntemler yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda semptomu olan hastanın tanısının konması zorlaşmakta, ileri tanı testlerinin mümkün olmadığı durumlarda ise imkansız hale gelmektedir.

Rutin mikrobiyolojik incelemede, uygun koşullarda elde edilen orta akım idrarında veya sonda ile alınan idrar örneğinde $10^5/\text{mm}^3$ 'te üzerinde bakteri kolonisinin tespiti tanı koydurucudur (2). Bu durumda geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ile üriner sistem infeksiyonuna neden olan etkenler tanımlanıp antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenir. Bu yöntemlerin sonuçsuz kaldığı durumlardan biri olan steril piyüri, klinik bir sorun olmakla birlikte mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan pek çok neden sonucu gelişebilmektedir

Chlamydia trachomatis, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Neisseria* spp. ve tüberküloz gibi atipik ya da zor üreyen mikroorganizmaların neden olduğu üriner sistem infeksiyonlarının rutin mikrobiyolojik tanı yöntemler ile saptanmaları güçtür (3). Standart

mikrobiyal kültürde üreme olmaksızın, idrarda $\geq 10/\text{HPF}$ (high-power field) lökosit bulunması durumu steril piyüri olarak adlandırılır (4). Kültürde retilmesi zor ve yavaş üreyen bu tür mikroorganizmaların tesptinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler tekniklerin kullanılması oldukça faydalıdır (5).

Bu çalışmada; steril piyürili hastalarda *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi kültürde üretilmesi zor mikroorganizmaların varlığını PZR ile saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Üriner sistem infeksiyonu terimi asemptomatik bakteriüriden, sepsisle seyreden akut piyelonefrite kadar değişebilen çok farklı klinik durumları içermektedir. Üriner sistem infeksiyonları günümüzde, tüm yaş gruplarında, hastane veya toplumsal kaynaklı olması farkı gözetilmeksizin hekimlerin en sık karşılaştıkları bakteriyel infeksiyonlardır. Bakteriüri ve piyürinin eşlik ettiği bu infeksiyonlarda, üropatojenlerin çoğu kolon florasından kaynaklanmaktadır. Bu patojenler sıklıkla rutin mikrobiyolojik tanı yöntemleri ile tanımlanabilmekle birlikte üriner sistem infeksiyonuna yol açan bazı mikroorganizmaların tanımlanması için rutin tetkikler yeterli olamamaktadır. Rutin mikrobiyolojik yöntemlerle saptanamayan ancak üriner sistem infeksiyonuna yol açabilen bazı mikroorganizmalara ait özellikler aşağıda belirtilmiştir (6, 7).

2.1. Mikoplazmalar

Mikoplazmalar; *Mollicutes* sınıfının, *Mycoplasmatales* takımındaki *Mycoplasmataceae* ailesinde yer alan, bilinen en küçük serbest yaşama yeteneğine sahip canlılardır. *Mycoplasmataceae* ailesinde *Mycoplasma* ve *Ureaplasma* olmak üzere iki cins bulunmaktadır (8). İlk mikoplazma bakterisi 1898’de Nocard ve Roux tarafından sıgırlardan izole edilmiş olup 1937’de de Dienes ve Edsal tarafından insanlardan izole edilmiştir (9).

İnsanlarda infeksiyon etkeni olarak saptanmış 15 mikoplazma türü bulunmasına rağmen bunlardan dört tanesi sıklıkla klinikte karşımıza çıkar. Bunlar; *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum*'dur. *Mycoplasma pneumoniae*, pnömoniye neden olurken *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* sıklıkla ürogenital sistem infeksiyonlarına yol açar ve genital mikoplazmalar olarak adlandırılırlar (10, 11). Daha az sıklıkta ise *M. fermentans*, *M. penetrans*, *M. primatum* ve *M. spermatophilum* görülebilmektedir (12). Ureaplazma türlerinden ise sadece *U. urealyticum* insanda patojendir. Doğada çok yaygın bulunmaları ve insanlarda kommensal olarak başlıca oral ve genital mukozada yerleşmiş olmaları, bu mikroorganizmaların her zaman gerçek bir infeksiyon nedeni olup olmadıklarının sorgulanmasına yol açmıştır (8).

Genital kanal örneklerinde pozitif kültürlerinin saptanmasının ardından uzun süre patolojik önemi ortaya konamamıştır. Ancak bazı mikoplazma türlerinin diğerlerinden önem bazında ayrılmasının ardından, cinsel yolla bulaşan hastalıkların patogenezinde belirgin oranda açıklık getirilmiştir (13).

2.1.1. Mikoplazmaların Mikrobiyolojik Özellikleri

Mikoplazmalar diğer bakteri ve virüslerde bulunmayan ve sterol içeren üç katmanlı bir hücre membranı ile çevrilidirler, ancak hücre duvarları bulunmamaktadır. Boyutları 150–250 nm olup, elastiki hücre yapıları ile bakterileri süzeabilen filtrelerden geçebilmektedirler (14). Bu özelliklerinden dolayı önceleri virüs sanılmış, (15) ancak hem deoksiribonükleik asit (DNA) ve hem de ribonükleik asit (RNA) içermeleri ve *in vivo* koşullarda ekstraselüler yaşayabilmelerinden dolayı bu gruptan ayrılmışlardır. Hücre duvarlarının olmaması nedeniyle diğer bakterilerin L formları oldukları düşünülen mikoplazmaların; L formlarının aksine sterol içermeleri, uygun çevresel koşullarda hücre duvarı olan forma dönüşmemeleri (16) ve bilinen hiçbir bakteriyle DNA homolojisi göstermemeleri nedeniyle ayrı bir cins oldukları kabul edilmiştir. Hücre duvarları olmadığı için gram boyama ile boyanamazlar ve beta laktam antibiyotiklere doğal dirençlidirler. Kuru ortam ve ozmotik basınca karşı duyarlı olan mikoplazmalar Giemsa veya Castaneda

boyaları ile boyanabilirler. Hareketsiz ve kapsülsüz olup; karanlık saha mikroskopu ya da faz kontrast mikroskopu ile görüntülenebilirler (8, 17).

2.1.2. Mikoplazmaların Sınıflandırılması

Uzun yıllar boyutları nedeniyle bakteriden çok virüs sınıfına yakın bulunan mikoplazmaların bağlı bulunduğu *Mollicutes* sınıfının, moleküler filogenetik rRNA çalışmaları sonucunda laktobasil grubuna ait Gram-pozitif bakterilerin dejenerasyonundan orijin aldığı ortaya konmuştur (9). *Mollicutes* sınıfı; *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* ve *Anaeroplasmatales* takımlarından oluşmaktadır.

Mycoplasmatales ailesi *Mycoplasma* ve *Ureaplasma* cinslerini içerir. *Mycoplasma* cinsi çeşitli bitki ve hayvanlarda, memeliler, böcekler, kuşlar ve sürüngenlerde kommensal, paraziter ya da patojen olarak bulunan yüzden fazla tür içerir (18, 19). Ureaplazmalar "T mikoplazmalar" olarak da bilinirler ve üreaz oluşturarak üreyi parçalama özellikleri nedeniyle ayrı bir cins olarak tanımlanmışlardır. On dört serotipi olmasına rağmen insanda hastalık yapan tek tür *U. urealyticum*'dur (20). Tablo 1'de *Mollicutes* sınıfına ait dört takım ve özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 1: *Mollicutes* sınıfına ait dört takım ve özellikleri (21).

Sınıflandırma	Sterol ihtiyacı	Genom büyüklüğü (kb)	G+C oranı	Diğer
Takım 1: <i>Mycoplasmatales</i>				İnsan ve hayvanlarda
Aile 1: <i>Mycoplasmataceae</i>				Optimum üreme
Cins 1: <i>Mycoplasma</i>	(+)	580-1,380	23-41	35-37 ⁰ C
Cins 2: <i>Ureaplasma</i>	(+)	730-1,160	27-30	
Takım 2: <i>Entomoplasmatales</i>				Böcek ve bitkilerde
Aile 1: <i>Entomoplasmataceae</i>				Optimum üreme
Cins 1: <i>Entomoplasma</i>	(+)	790-1,140	27-29	30-37 ⁰ C
Cins 2: <i>Mesoplasma</i>	(-)	871-1,100	27-30	
Aile 2: <i>Spiroplasmataceae</i>				
Cins 1: <i>Spiroplasma</i>	(+)	940-2,200	25-31	
Takım 3: <i>Acholeplasmatales</i>				Hayvan, böcek ve bitkilerde
Aile 1: <i>Acholeplasmataceae</i>				Optimum üreme
Cins 1: <i>Acholeplasma</i>	(-)	1,500-1,690	27-36	30-37 ⁰ C
Takım 4: <i>Anaeroplasmatales</i>				Koyun ve büyükbaş
Aile 1: <i>Anaeroplasmataceae</i>				Anaerobik
Cins 1: <i>Anaeroplasma</i>	(+)	1600	29-33	
Cins 2: <i>Asteroplasma</i>	(-)	1600	40	

2.1.3. Mikoplazmaların Üreme Özellikleri

Mikoplazmalar genel üretim besiyerlerinde üretilemezler. Üretilibilmeleri için besiyerinde %20–30 at serumu veya haben sıvısı, pepton, sterol, maya ekstresi ve sığır kalp

infüzyon buyyonu gibi zenginleştirici maddeler olmalıdır. Pek çoğu fakültatif anaerop olup %5–10 CO₂'li ortamda iyi ürerler. Sıvı besiyerlerinde bulanıklık oluşturmayıp renk değişikliğine neden olabilirler. Katı besiyerinde koloni merkezindeki üreme besiyerinin derinliğine doğru, periferindeki üreme ise yüzeyel olduğundan, tipik olarak ortası kabarık yanları basık “sahanda yumurta” görünümünde (*M. pneumoniae* hariç) koloniler oluştururlar. Ortalama koloni çapı 200-300 nm büyüklüğünde olmakla birlikte embriyonlu yumurta ve koryoallantoik zarda üretilebilirler. Doku kültüründe hücre yüzeylerinde üretilebilir ve diğer doku kültürlerini kontamine edebilirler (22).

Ureaplazma türleri ise, sahip oldukları üreaz ile üreyi parçalamaları nedeniyle ayrı bir cins olarak tanımlanmasına rağmen hala ürenin üreaplazmalar için enerji kaynağı olup olmadığı bilinmemektedir. Koloni çapları yaklaşık 300 nm büyüklüğünde olan bu mikroorganizmalar, katı besiyerinde 1–4 gün gibi kısa sürede ürerler. Yüzde doksan beş N₂ ve %5 CO₂ içeren ortamda ve sadece pH'sı 6.5 veya daha düşük olan besiyerlerinde üretilebilirler. Üreyi amonyağa parçalamaları sonucu bulunduğu sıvı ortamın pH'sını yükseltip fenol kırmızısı gibi indikatörlerin rengini sarıdan kırmızıya dönüştürürler. Bu şekilde mikroorganizmanın üremesi saptanabilir (22).

2.1.4. Mikoplazmaların Antijenik Özellikleri

Mikoplazmaların klinikte yüzeyel infeksiyonlar oluşturmaları nedeniyle kolonizasyonunda adezyon proteinlerinin rolü büyüktür (23). *Mycoplasma hominis*' in P50 ve P100 yüzey polipeptidleri ökaryotik hücrelere yapışmayı sağlar (23). P50 adezyon proteinleri hücre yüzeyindeki sülfatidlere bağlanma gösterirken, rekombinant P50 proteinlerinin HeLa hücrelerine bağlanması yüksek moleküler ağırlıklı dekstronlarca inhibe edilir. Sülfatlı glikolipidler ve diğer glikokonjugatlar erkek ve kadın ürogenital sisteminde yüksek konsantrasyonda bulunurlar. *Mycoplasma hominis*'in bu hedeflerle spesifik etkileşimi etkenin ürogenital sistem tropizmini açıklamaya yardımcı olur. *Mycoplasma hominis*'in P100 adezyon lipoproteini, hücre membranından peptid transportu için substrat bağlayıcı bölgeye sahiptir (24). *Mycoplasma hominis* suşları; vaa (variable adherence-associated) olarak adlandırılan ve altı farklı gen tipiyle kodlanan ve adezyonla ilişkili yüzey

proteinine sahiptir (25). Bu genin ifadesinin açılıp kapanabilir özellikte olması ve C ucunun yüksek değişkenlik göstermesi yetersiz antikor yanıtının yanı sıra organizmanın bir hücreden diğerine yayılmasını da sağlar (26).

Mycoplasma genitalium ise; *M. pneumoniae*'da da bulunan ve antikor yanıtı oluşması nedeniyle serolojik tanıda da kullanılabilen P1 proteinine benzer, konak hücre yüzeyine adezyondan sorumlu MgPa adlı bir yüzey proteinine sahiptir (26).

Ureaplasma urealyticum'un plazma membranından elde edilen üç fosfolipaz enzimi (A1, A2, C) mikroorganizmanın virölansı ile ilişkilidir (27). *Ureaplasma urealyticum* amniyonit, perinatal morbidite ve mortaliteyle ilişkili olup ürogenital sistemde fosfolipaz üretimiyle ilişkili patolojik olaylar sürecini başlattığı bilinmektedir (28). Hem *M. hominis* hem de *U. urealyticum* IgA proteaz üreterek salgısal IgA'yı parçalayıp ve mukozal invazyonlara neden olabilir. Ayrıca üreaplazmaların spermatozoon membranına yapışarak sperm motilitesini azalttığı da saptanmıştır (28).

2.1.5. Mikoplazmaların Epidemiyolojisi

Sosyoekonomik düzey, yaş, ırk, cinsel aktivite, çok eşlilik ve hormonal değişikliklerin görüldüğü hamilelik dönemi, mikoplazmaların genitoüriner sistemde görülme sıklıklarına etki edebilen faktörlerdir (28, 29). Mikoplazmaların çocuk ve erişkin yaş gruplarında, değişen sıklıkta genital kolonizasyonları mevcuttur. Gelişmekte olan fetüs, anne ürogenital sistem florasından korunmuşken, doğum kanalından geçişi takiben fetüsün bu mikroorganizmalarla kolonize olduğu bildirilmiştir. Kız bebeklerin 1/3'ünde Üreaplazmalar izole edilirken, *M. hominis* ve *M. genitalium* için bu oran daha düşüktür. Erkek bebeklerde ise bu mikroorganizmalar daha az bulunur (30). Genital kolonizasyon sıklığı puberte sonrasında cinsel ilişkinin varlığı, cinsel eş sayısı ve sosyoekonomik durum ile doğru orantılıdır. Avrupa ülkeleri ve Amerika için 50 yaş altında genital mikoplazma kolonizasyon sıklığı 1/3–1/2 oranında değişmektedir (31).

Ülkemizde daha çok *M. hominis* ve *U. urealyticum* araştırılmış olup, *M. hominis* sıklığı %2-27 arasında bulunmuştur (32, 33). Gebe kadınlarda, genitoüriner sistemde, mikoplazma sıklığının araştırıldığı bir çalışmada ise *U. urealyticum*'un %44 oranıyla

genital kanaldan en sık soyutlanan mikroorganizma olduğu saptanmıştır. Gebe kadınlarda gebe olmayanlara göre daha sık saptanmakla birlikte menopoz sonrası mikroorganizmanın izolasyon sıklığı azalır (28, 29, 32). Fertil ve infertil kadınlarda genital mikoplazma kolonizasyonunun araştırıldığı bir diğer çalışmada ise infertil grupta üreaplasma sıklığı %48,4 olarak bildirilmiş ve kontrol grubuyla arasında anlamlı fark bulunmuştur (34).

2.1.6. Örnek Toplanması

Genital mikoplazmaların üretilmesinde; üretral, vajinal/servikal sürüntü örnekleri, prostat sıvısı, semen, idrar, kan, beyin-omurilik sıvısı, amniyotik sıvı, solunum yolu sıvıları, sinoviyal sıvı ve perikard sıvısı gibi çeşitli vücut sıvıları örnek olarak kabul edilebilir (35).

Sürüntü örnekleri plastik ya da alüminyum saplı; dakron, kalsiyum aljinat ya da polyester eküvyonlar kullanılarak alınmalıdır. Pamuklu eküvyonlar toksik olabileceğinden dolayı kullanılmamalıdır. Eküvyon yüzeyinin antiseptik çözeltiler, krem, jel veya kayganlaştırıcılarla temasından kaçınılmalıdır. Mikoplazmaların çevre koşullarına duyarlı olmaları nedeniyle sürüntü örneklerinin kurumasına izin verilmemeli ve toplandıktan hemen sonra transport besiyerine (2SP-broth, SP-4, Shepard's 10B-broth) alınmalı ya da hemen ekim yapılmalıdır. Vücut sıvıları ve doku örnekleri steril kaplara konulmalıdır (29).

Tuzlu su organizmanın lizisine neden olacağından dolayı doku örneklerinin nemlendirilmesinde kullanılması uygun değildir. Laboratuvar da doku örnekleri steril transport tüpünde homojenize edilmeli (%10 süspansiyon oluşturacak şekilde) ve seri olarak 10 ve 100 kat seyreltilmelidir. Bu işlem doku üzerinde bulunabilecek hemoglobini, toksik fosfolipidler, antikorlar veya komplemanlar gibi mikoplazmaların üremesini inhibe edecek maddelerden mikroorganizmanın korunmasını sağlar (35).

Örnekler sıvı besiyerine inokülasyon öncesinde +4°C'de 24 saat bekletilebilir. Kültür işlemi gecikecekse -70°C'de dondurulup çalışma öncesinde 37°C'de su banyosunda hızlıca çözündürülmelidir (29, 35).

2.1.7. Mikoplazmaların Laboratuvar Tanısı

Mikoplazmaların laboratuvar tanısında kültür, direkt tanı yöntemleri ve serolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de kullanılmaktadır

a) Mikroskopi: Mikoplazmalar Gram negatif sayılmakla birlikte Gram boyama tekniği ile iyi boyanamazlar. Giemsa ve Castenada boyalarıyla iyi boyanırlarsa da çok küçük oldukları için mikroskopide görmek zor olup tanıda bu tür incelemeler önerilmez (23, 36).

b) Kültür: Genital sürüntü ve idrar örnekleri kültür için uygun numune olmalarına rağmen, idrarda sürüntü örneğine oranla daha az mikroorganizma bulunması nedeniyle idrarın prostat masajı sonrası alınması ya da miksiyonun değişik periyodlarında (ilk-orta-son idrar) birden fazla örnek alınması kültürün duyarlılığını artırır (37). Genitoüriner sistemden izole edilebilen mikoplazmalardan *M. hominis* ve *U. urealyticum* 1-5 gün arası üreme süresiyle kolaylıkla izole edilebilirken *M. genitalium* ve *M. fermentans* yavaş üremeleri nedeniyle kültürde zor saptanırlar. *Mycoplasma hominis* ve *U. urealyticum* kültürü için transport besiyerine alınmış uygun örnekler hem katı (Shepard A-7 ayırdedici agar) hem de sıvı (M-broth, U-broth) besiyerlerine 0,2'şer ml inoküle edilip %5-10 CO₂'li ortamda 35°C'de inkübe edilir. *Mycoplasma hominis*'in sahanda yumurta görünümlü kolonilerinin ve *U. urealyticum*'un küçük kolonilerinin varlığı, katı besiyerinin 40X büyütmede günlük kontrolü ile takip edilir. *Mycoplasma hominis* M-broth'da bulanıklığa ek olarak renk değişikliği gösterirken, *U. urealyticum* sadece renk değişikliği yapar. Her iki durumda da artan pH ve substrat eksikliğine bağlı mikroorganizma ölümü gerçekleşmeden bakteri izolasyonu için hemen pasaj alınmalıdır. Pasaj petrilere 1-5 gün süresince takip edilip, üreme olmazsa negatif kültür sonucu verilebilir. *Mycoplasma hominis*'in sahanda yumurta görünümlü kolonileri Dienes boyası ile daha belirgin hale getirilebilir. *Ureaplasma urealyticum*'un küçük kolonilerinin artefaktlardan ayrılabilmesi için üre hidrolizine bakılır. Eğer U agar içerisinde şüpheli koloni varsa fenol kırmızısı indikatörü ile koloni etrafında kırmızı bir alan oluşur (19). Yine *M. genitalium*'un glikozu kullanması ve çoğu laboratuvar da genitoüriner sistem örneklerinin kültüründe glikoz içeren besiyeri kullanılmaması da kültür sonucunun klinik kullanımda değersiz olmasına neden olmaktadır

(18, 19). Kültür bazlı metodların kullanılmasıyla *M. genitalium*'un saptanmasının zorluğu Jensen ve arkadaşlarının çalışmaları ile de ortaya konmuş olmakla birlikte kültürün takibine ek olarak PZR yönteminin gerekli olduğu da öngörülmüştür (38). Bu açıdan genitoüriner örneklerden mikoplazmaların saptanmasını sağlayan yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip PZR metodları mevcut olmakla birlikte rutin kullanımları yaygın değildir (39-41).

c) Serolojik Tanı: Lipid ilişkili membran proteinleri (LAMP) mikoplazmalardaki yüzey proteinlerinin büyük kısmını oluşturup antijenik özelliklerinden dolayı mikoplazmalara karşı immün yanıt için ana hedeflerdir. Lipid ilişkili membran proteinleri; *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. salivarium*, *M. penetrans* ve *M. pirum* dahil birkaç mikoplazma türünde tanımlanmakla birlikte, serolojik kitlerde kullanılmaktadır. Bu antijenlere karşı oluşan antikorlar oldukça özgül olup diğer türlerle çapraz reaksiyon vermezler. Lipid ilişkili membran proteinleri antijenlerine karşı oluşan antikorlar *M. hominis*'in serotiplendirilmesinde de kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek immünojenitesi nedeniyle ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)'da hedef antijen olarak da kullanılabilir (19).

Serolojik yöntemler *U. urealyticum* infeksiyonu tespit edilmesinde de kullanılmaktadır. Antijen olarak saflaştırılmış mikroorganizma sonikatlarının kullanıldığı ELISA ve ‘‘Western Immunoblot’’ teknikleri bu açıdan değerlidir. ‘‘Western Immunoblot’’ tekniğinde antijenler, kültürde *U. urealyticum* serovarının üretilmesi ile hazırlanır. Mikroorganizma sodyum dodesil sülfat (SDS) ile parçalanıp elektroforez ile ayrıldıktan sonra nitroselüloz kağıda aktarılır (19). Yine ‘‘Western Immunoblot’’ yöntemiyle MgPa adezin genleri kullanılarak mikoplazma suşları ayrıştırılabilir (13). Bu iki serolojik teknik dışında floresan antikor tekniği, indirekt hemaglütinasyon ve lateks aglütinasyon da kullanılmaktadır (42).

d) Moleküler Tanı: Klinikte önem arzeden ve insanda hastalık etkeni olarak kabul edilen mikoplazma türleri için geliştirilmiş PZR sistemleri mevcuttur (43, 44). Bu etkenlerin tespit edilmesi için; *M. fermentans*'ın ‘insertion-like’ elementlerini (45), *Mycoplasma pneumoniae*'nın P1 (46) ve *M. genitalium*'un MgPa (43) adezinini ve  reaplazma türleri için üreaz (47) kodlayan genler PZR için hedef bölgeler arasındadır.

Mycoplasma pneumoniae, *M. genitalium* ve *M. fermentans* gibi üreme hızı düşük ve identifikasyonu zor mikroorganizmaların tespiti için PZR'nun kullanımı uygun ve faydalıdır. Teorik olarak tek bir mikroorganizmayı saptayabilen PZR yönteminin, duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir. Ayrıca moleküler yöntemlerle, antibiyotik direnç ve virülans genleri de araştırılabilir. Klinik açıdan önemli pek çok mikroorganizmanın PZR ile tanı maliyetinin kültüre göre yüksek olması, bunun yanında kontaminasyon ve inhibitörlerin varlığı gibi bazı problemler de bu yöntemin rutin laboratuvar işleyişinde yer almasını engellemektedir (19).

2.2. *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae*

Chlamydia trachomatis ve *Neisseria gonorrhoeae* dünya genelinde en sık rastlanan cinsel yolla bulaşan hastalık etkenleridir (48). Bakteriyolojik tanımlamalarının 19-20.yy'lara kadar yapılamamasına rağmen, muhtemelen klinik semptomlar bu bakterilerin eski literatürlerde bile yer almalarına neden olmuştur (49). Bu iki bakterinin etken olduğu genital hastalıkların klinik spektrumu oldukça benzer olmakla birlikte genel olarak erkeklerde üretrit, kadınlarda ise üretrit ve serviste neden olmaktadır. Özellikle kadınlarda semptom yokluğu ya da az miktarda akıntı sıkça karşılaşılan durumlardır. Orofaringeal infeksiyonlar her iki cinste görülebilmekle birlikte yenidoğanlarda infekte anneden edinilmiş göz infeksiyonları da görülebilmektedir. Bununla birlikte yetişkinlerde de kendi genital infeksiyonlarından otoinokülasyonla gelişen konjunktivit görülebilmektedir (50, 51).

Chlamydia trachomatis ve *N.gonorrhoeae*'ye bağlı komplikasyonlar sıklıkla kadınlarda görülmektedir. Asendan genital sistem infeksiyonları; endometrium, fallop tüpleri ve/veya bitişik pelvik dokuların etkilendiği pelvik inflamatuvar hastalığa (PİH) yol açabilmekle birlikte infertilite, ektopik gebelik ve kronik pelvik ağrının da nedeni olabilirler (52, 53).

2.2.1. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia türleri; emsalsiz üreme özellikleri ile diğer tüm mikroorganizmalardan ayrılırlar (54). Uzun yıllar boyunca virüs olarak kabul edilen klamidyalara; zorunlu hücre içi

bakterilerdir. Bölünerek çoğalmaları, hem DNA hem RNA içermeleri, ribozom ve metabolik aktivite sağlayan enzimlerinin bulunması, Gram negatif bakterilere benzer hücre duvarı taşımaları ve antibiyotiklere duyarlı olmaları nedeniyle bakteriler arasında yer almaktadırlar (55, 56).

Klamidyalarla ilgili ilk bilgiler milattan öncesine dayanmakla birlikte, genital enfeksiyonlarla ilişkisi 20.yy'a kadar tanımlanamamıştır (57). Lindner'in 1911'de; ürogenital sisteminde klamidyal enfeksiyonu olan anneden doğan bebeğin konjunktivasında intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerini göstermesi ile *Chlamydia* ve genitooküler enfeksiyonlar arasında ilişki olduğu anlaşılmıştır (58, 59). İlk kez 1913 yılında Durand, Nicolas ve Favre tarafından "Lenfogradüloza Venereum" (LGV) tanımlanmış olup takip eden yıllarda Frei'in geliştirdiği deri testi ile LGV sifilizden ayırt edilmiştir (55, 57). İnsanlarda patojen olan üç tür; *C. psittaci*, *C. trachomatis* ve *C. pneumoniae*'dir. Bunlardan *C. trachomatis*'in tek konağı insan olup; trahom, LGV, yenidoğan inklüzyonlu konjunktiviti ile erkek ve kadında non-spesifik ürogenital enfeksiyonlara neden olmaktadır (60).

2.2.1.1. *C. trachomatis* 'in Mikrobiyolojik Özellikleri

Klamidyalar konak hücre sitoplazması içinde inklüzyon oluşturarak çoğalmaları ve dimorfik üreme özelliklerinden dolayı diğer bakterilerden ayrılırlar. Klamidyalar flagella ve pilusu olmayan, hareketsiz, zorunlu hücre içi bakterilerdir (61). Mikoplazmalardan sonra bilinen en küçük prokaryotik genoma sahip olan klamidyalar, 1200 kilobaz (kb) büyüklüğünde çift iplikçikli çembersel bir DNA'ya sahiptirler (62, 63). Kendi metabolik aktiviteleri ile enerji oluşturmamaları ve konak hücrenin enerji kaynaklarını kullanmaları nedeniyle "enerji parazit"i olarak adlandırılırlar (64).

Klamidyalar dimorfik üreme özellikleri nedeniyle üç ayrı formda izlenebilirler. Bunlardan ilki elementer cisimcik (EC) olup, bakterinin hücre dışı ortamda stabilitesini koruyabilen formudur. Konak hücreye bağlanıp içeri girinceye kadar metabolik olarak inaktif ve dış koşullara karşı dayanıklıdır. Hücre dışında çoğalmaksızın canlılıklarını sürdürebilen ve enfeksiyöz olan formdur (65). Bu yapılar küçük, yuvarlak, 150-350 nm çapında, elektron yoğun cisimcikler olup hemaglütinin içerirler (66). Peptidoglikan tabakası

içermemesine rağmen, disülfid bağları ile bağlanmış major dış membran proteini (MOMP) sayesinde dış etkilere karşı oldukça dirençlidir. Hücre duvarlarının başlıca bir proteinden oluşması, peptidoglikan içermemesi ve periplazmik aralığının bulunmamasıyla Gram negatif bakterilerden farklıdır (57, 67, 68).

Retiküler (inisiyal) cisimcik (RC) ise, klamidyal yaşam döngüsü içinde çoğalabilen, konak hücre içerisindeki formudur. Ortalama 800-1500 nm çapında olup metabolik olarak aktiftirler. Ribozomlardan zengin olmakla birlikte diffüz ve fibriler DNA'ya sahiptirler. Hücre duvarı, lipopolisakkarit (LPS)'ten zengindir ve hemaglutinin içermezler. Metabolik olarak çok aktif olmalarına karşın ATP sentezi yapamayıp, ATP/ADP transport sistemi ile konak hücreden enerji gereksinimini karşılarlar. Nükleik asit prekürsörlerini konak hücreden sağlayıp kendi enzimlerini kullanarak DNA ve RNA moleküllerini sentezleyebilirler. *Chlamydia trachomatis*'te diğer türlerden farklı olarak, RC'lerin içinde glikojen depoları vardır (57, 61, 67-69).

Bifazik yaşam döngüsü içinde yukarıda belirtilen üç formda izlenebilen klamidyalar; gelişme dönemlerine göre farklı boyanma özellikleri gösterirler. Gram boyası bu formların gösterilmesinde etkisiz kalırken enfeksiyöz olmayan büyük RC'ler Giemsa boyası ile mavi renkte izlenirler. Elementer cisimcik ise Giemsa boyası ile mora, Macchiavello boyasıyla maviye boyanan sitoplazma ile zıt olarak kırmızıya boyanır. Gimenez boyası korbolfuksin içerdiğinden dolayı inklüzyon cisimciklerini daha iyi boyar, ancak Giemsa boyası daha yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünfloresan yöntemle de boyanabilen klamidyalar parlak yeşil renkte izlenirler (67, 70, 71).

2.2.1.2. *C. trachomatis*'in Yaşam Döngüsü

Konak hücre sitoplazmasında inklüzyon oluşturarak üreyen klamidyaların üreme döngüsü EC'nin konak hücreye adezyonunu takiben gerçekleşen fagositozla (endositoz) başlar (72, 73). Adezyonda konak hücre reseptörleri, elektrostatik güçler ve EC'nin hemaglutininini rol oynarken klatrin kaplı kanallar aracılığı ile endositoz en önemli aşamadır (57, 73, 74). Fagositozu takiben EC konak hücre sitoplazması kaynaklı bir membranla sarılıp sitoplazmik bir vakuol oluşturur. Fagolizozom birleşmesini önleyerek lizozomal

enzimlerden kurtulan EC'nin bunu hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği bilinmemektedir (57). Bu sitoplazmik vakuoller golgi aparatına gelerek hızlı konak yanıtının başlamasına neden olurlar (61, 75, 76). Sitoplazmik vakuoller içinde, enfeksiyonun 6-8. saatlerinde EC'nin RC'ye dönüşümü tamamlanır. Metabolik aktif RC'ler ikiye bölünerek çoğalmaya başlarlar. Cisimciklerin boyutları küçülüp sayıları artarken vakuoller büyüyüp inklüzyon cisimlerini oluştururlar. Protein ve karbonhidrat sentezinin başlamasıyla yoğunlaşan cisimcikler EC'ye dönüşmeye başlarlar. MOMP'deki değişiklikler ve disülfid bağlarının artışı ile EC'nin dayanıklı yapısı oluşur. Klamidyal proteinazların da etkisiyle veziküller yırtılıp, EC'ler başka hücreleri enfekte etmek üzere dış ortama salınırlar. Bu yaşam döngüsü 48-72 saatte tamamlanır (55, 57, 65).

2.2.1.3. Klamidyal Sınıflandırılması

Yıllarca virüs mü bakteri mi olduğu tartışma konusu olan klamidyal ilk sınıflandırması Page tarafından *C. trachomatis* ve *C. psittaci* şeklinde yapılmıştır. Wang ve Grayston ise, klamidyal antikorları mikroiimmünfloresan yöntemiyle saptamış ve immünolojik bir tiplendirme yapmışlardır. *Chlamydiales* takımı 1984 yılında "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"nin ilk cildinde oluşturulmuş; tek aile olarak *Chlamydiaceae*, tek cins olarak da *Chlamydia* kabul edilmiştir. Bu cins içerisinde *C. trachomatis* ve *C. psittaci* yer almıştır (67, 77).

Günümüzde 16S ve 23S rRNA dizi analizi baz alınarak yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmada *Chlamydiales* takımı *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*) ve *Chlamydiophila* (*Chlamydiophila psittaci*, *Chlamydiophila pneumoniae*, *Chlamydiophila pecorum*, *Chlamydiophila felis*, *Chlamydiophila caviae*, *Chlamydiophila abortus*) olarak iki cinse ayrılmıştır (78, 79).

Genitoüriner ve oküler hastalıklara neden olan *C. trachomatis*'in üç biyovarı tanımlanmış olmakla birlikte bunlar *biovar trachoma*, *biovar lymphogranuloma venereum*, *biovar mouse pneumonitis*'tir. *Chlamydia trachomatis*'in *trachoma* ve *lymphogranuloma venereum* biyovarları antijenik çapraz reaksiyona göre, mikroiimmünfloresan yöntem kullanılarak sınıflandırılmış olup 18 serovar tespit edilmiştir. Bunlardan dördü (L1, L2,

L2a, L3) LGV ile ilişkilidir. *Trachoma* biyovarında ise 14 serovar mevcut olup okülojenital enfeksiyonlara neden olurlar. Genital enfeksiyonlara D-K, Da, Ia sebep olurken, trachoma neden olan A, B, Ba, C serovarlarından B ve Ba da genital sitemden izole edilmiştir. Monoklonal antikor tiplendirmesi ve genotipik DNA analiziyle tanımlanan bu biyovaryaların daha sonra antijenik olarak farklı MOMP'yi kodlayan OMP1 geninin nükleotid dizilimleri ve PZR ile minor varyantları tanımlanmıştır (70, 80).

2.2.1.4. *C. trachomatis*'in Antijenik Özellikleri

Klamidyal zarın komponentleri ilk kez Raulston'un bir çalışmasında incelenmiş olup çoğu yüzey yapısıyla ilişkili pek çok protein yapı mevcuttur (81, 82).

a) Lipopolisakkaritler (LPS): Klamidyalarda ortak olarak var olmakla birlikte cinse özgül olan LPS'ler ısıya dayanıklı lipoprotein-karbonhidrat kompleksleridir (55, 83). Gram negatif enterik bakterilerde bulunanlara çok benzeyen fakat ilave bir antijenik determinant taşıyan bu LPS'lerin tanıda yeri oldukça azdır (57, 82).

b) Dış Membran Proteinleri (Outer Membrane Proteins=OMP): Klamidyalarda dış membranında eksprese edilen bu proteinler; MOMP (40kDa), OMP2 (60 kDa) ve düşük moleküler ağırlıklı bir proteinden ibarettir (81, 83, 84). Bunlardan en önemlisi MOMP olup bu yapı *C. trachomatis*'in farklı serovarlarının sınıflandırılmasında temel olarak kullanılır ve türe özgüdür. MOMP'yi kodlayan OMP 1 geni her üç patojenik *Chlamydia* türünde de bulunup, *C. trachomatis*'in genotipik belirlenmesinde kullanılır. Bu gen; türler arası çeşitlilikten sorumlu beşi korunmuş, dördü değişken (VDI-VDIV) alandan oluşur (85). Ayrıca *C. trachomatis*'in MOMP'sine karşı gelişen nötralizan antikorlar *C. trachomatis*'in enfektivitesini *in vitro* olarak inhibe ederler ve MIF testindeki reaksiyonların büyük çoğunluğundan bu antikorlar sorumludur (57).

c) Isı Şok Proteinleri (Heat shock proteins=HSP): Bazı durumlarda gama interferon etkisi ile hücre içi triptofan miktarının azalmasıyla hücre stres altında kalmakta, bu durum da klamidyalarda gen regülasyonunu değiştirmesine ve bazı proteinlerin artmasına neden olmaktadır. Isı şok proteinleri bu artış gösteren proteinlerden olup gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olmaktadır (5). Bu proteinler;

hücrelerin uygunsuz dış koşullara direncinde önemli rol oynamakla birlikte; çalışan major klamidyal ısı şok proteinleri GroEL (Hsp60), GroES (Hsp10) ve DnaK (Hsp70)'dir (86).

d) Hücre Bağlanma Proteinleri: *Chlamydia trachomatis*'in EC'leri hücre bağlanma proteinleri ile HeLa hücrelerine bağlanır ancak RC'lerde hücre bağlanma proteinleri mevcut değildir. Bağlanma proteinlere karşı oluşan antikorların EC'lerin hücrelere bağlanmasını engellediği ve enfektiviteyi nötralize ettiği bildirilmiştir (87).

2.2.1.5. *C. trachomatis*'in Epidemiyolojisi

Yıllık ortalama 2,8 milyon yeni olgunun olduğu tahmin edilen ancak çoğuna tanı koyulamayan *C. trachomatis* infeksiyonları Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2006 yılında bir milyondan fazla olguyla en sık bildirilen infeksiyon olmuştur (88). Dünya genelinde *C. trachomatis* infeksiyonları ile ilişkili en önemli demografik faktörün yaş olduğu bildirilmiş, özellikle genç kadınların (<20 yaş) infeksiyon açısından risk grubunda olduğu ortaya konmuştur. Yirmi yaş altındaki genç kadınlarda serviksin skuamo-kolumnar bileşke bölgesinin serviks ağzına ektopi yapması nedeniyle *C. trachomatis*'in infeksiyondaki hedefi olan kolumnar epitele daha kolay ve çok sayıda ulaşması mümkün olmaktadır (82).

Daha ileri yaş grubundaki kadınlarda ise diğer demografik faktörler devreye girmekle birlikte riski arttıran demografik faktörler arasında bekar kadınlar, nulliparite, siyah ırk ve düşük sosyoekonomik durum bildirilmiştir. Cinsel partner sayısının çok olması, yeni bir cinsel partnerin varlığı, bariyer cinsi kontraseptif araçların kullanılmaması ve gonokokal infeksiyon varlığı da *C. trachomatis* infeksiyonları ile yakından ilişkili faktörlerdir (82). Hastalığın sıklıkla asemptomatik veya hafif semptomlarla seyretmesi ve persistans göstermesi nedeniyle enfekte bireyler en önemli kaynaktır.

Lenfogranüloma Venereum, *C. trachomatis*'in etken olduğu bir diğer hastalık olup güneydoğu Asya ve Afrika'da endemik, Avrupa ve Kuzey Amerika'da sporadik olarak görülmektedir (89). Genital infeksiyonlardan izole edilen B, Ba, D-K serovarlarının trahomun endemik olduğu ve olmadığı bölgelerdeki gerçek insidansı ise bilinmemektedir

(33, 55). Erişkinlerde yaptıkları hastalıklar ve komplikasyonların yanısıra genitoüriner klamidyal infeksiyonlar yenidoğanlarda da morbiditeye neden olmaktadır (55).

Ülkemizde genitoüriner klamidyal infeksiyonlar ile ilgili bilgiler, son 15–20 yıl içerisinde ortaya konulmaya başlanmış, 1990’lı yılların sonlarında ülkemizde cinsel temasla bulaşan hastalık etkenlerinden biri olan *C. trachomatis* üzerine yapılmış olan bir çalışmada olguların %34,4’ünde *C. trachomatis* saptanmıştır (90). Etkili aşılardan yoksulluğundan dolayı; yüksek sensitiviteli ve spesifik laboratuvar tanı testleri, etkin antibiyotik tedavisi, bulaş yolları ve yüksek insidanslı grupların belirlenmesi ve güvenli cinsel hayat konusunda halkın eğitimi *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* infeksiyonlarının önlenmesinde temel niteliğindedir (52, 53, 91, 92).

Ülkemizde *Chlamydia* infeksiyonlarının epidemiyolojik verileri sadece bölgesel verilere dayanmakla birlikte aralarında prevalans açısından büyük farklılıklar bulunmaktadır (93). Ülkemizde risk faktörleri ile infeksiyon ilişkisini gösteren çalışmalar mevcut değildir. Dünya genelinde geçerli risk faktörleri, ülkemizde de kabul edilebilmekle birlikte, toplumsal davranış farklılıklarından kaynaklanan farklı risk faktörleri ile de karşılaşılabılır.

2.2.1.6. Örnek Toplanması

Klamidyalara bağlı ürogenital hastalıkların laboratuvar tanısında; üretral, servikal veya rektal kazıntı örnekleri ve doku biyopsileri kıymetli örnekler iken, idrar da kabul edilebilir örnekler arasında yer alır. Örnek alımı sırasında epitel hücrelerinin toplanmasına özen gösterilmelidir. Serolojik incelemeler için de kan kullanılmaktadır (94, 95).

Toplanan örnekler, kontaminasyonun önlenmesi için antibiyotik ve antifungal içeren ‘‘sucrose-phosphate buffer’’ (2SP) gibi bir taşıyıcı ortama konulur. Penisilin türevi antibiyotikler *in vitro* inhibitör etki gösterdikleri için taşıyıcı ortamda bulunmamalıdır. İyi bir kültür için örneklerin toplandıktan kısa bir süre sonra inoküle edilmesi tercih edilmektedir. Ancak taşıyıcı ortamda +4°C’de 24 saat bekletilebilir. İnokülasyon için uzun süre beklenenecekse hızla dondurulmalı ve -70°C’de saklanmalıdır. Donmuş örnekler

inokülasyondan hemen önce 37°C'lik su banyosunda hızla çözölmelidir. Bu tek dondurup çözme işlemi bile enfektiviteyi azaltabilir (94).

2.2.1.7. *C. trachomatis* Laboratuvar Tanısı

Chlamydia trachomatis infeksiyonlarının klinik tanısının zor olması nedeniyle laboratuvar tanısı önemlidir. Laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler mikroskopik inceleme, hücre kültürü, serolojik yöntemler (indirek floresan antikor testi, mikroimmünfloresan testi) ile antikor aranması, antijen tayini yöntemleri (ELISA, direk floresan antikor testi (DFA) ve hızlı testler) ve moleküler tanı testleri (nükleik asit amplifikasyon testleri)'dir (96).

a) Mikroskopik İnceleme: Klamidyal inklüzyon cisimciklerinin Giemsa veya iyot ile boyanarak izlenmesine dayanan tarihi bir yöntemdir. Günümüzde bazen neonatal inklüzyon konjunktiviti olgularının ön tanısında kullanılmaktadır. Gimenez yöntemi (kربولfuksin içeriğinden dolayı) ile inklüzyon cisimcikleri daha iyi boyanmasına rağmen, Giemsa boyası daha yaygın kullanılmaktadır (71).

Genital bölge infeksiyonlarında Giemsa'nın duyarlılığı az olmakla birlikte hızlı tanı açısından önemlidir (97). Mikroskopik yöntemlerden immünfloresan ve immünperoksidaz boyama yöntemleri daha duyarlı ve özgül olmaları nedeniyle diğer boyama yöntemlerinin yerini almaya başlamıştır (82, 98).

b) Hücre Kültürü: Hücre kültürü, günümüzde *C. trachomatis*'in canlı olarak saptanabildiği tek yöntemdir. Geçmişte yeni tanısal testlerin spesifite ve sensitivitelerinin değerlendirilmesi ve geçerliliğinin kabulünde referans yöntem olarak kabul edilmiştir (99). Hücre kültüründe McCoy, HeLa, Hep-2 ve BHK-21 hücreleri kullanılabilmekle birlikte en sık kullanılanı insan sinoviyal hücrelerinden üretilen, daha sonraları fare fibroblastları ile kontamine olmuş ve bugünkü özelliklerini kazanmış bir doku kültürü sistemi olan McCoy hücreleridir (64, 95, 98).

Numune uygun transport besiyerinde taşınıp sonrasında McCoy hücre kültürü ortamına inoküle edilir. İntrasitoplazmik inklüzyonlar 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında

enfekte hücrelerde belirir. Bu inklüzyonlar; *C. trachomatis* ve diğer klamidyalara özgül bir protein olan MOMP'e spesifik floresanla işaretlenmiş monoklonal antikorlar ile saptanabilir (85). Hücre kültürleri antibiyotik duyarlılık testleri için klinik izolat elde edilebilen tek metoddur (100).

Tanıda hücre kültürünün dezavantajları, bazı kültür dışı tanı yöntemlerine oranla (örn; PZR, DFA) düşük duyarlılık, 3-7 gün gibi uzun bir sürede sonuç vermesi, standardizasyondaki zorluk (uygun muayene maddesi, kullanılan eküvyonun özelliği, transport ortamı, besiyerinin özelliği, sonuçların yorumlanması vs.), teknik karmaşıklık, klinik örneklerin taşınmasında kesinlikle soğuk zincire uyulma gereksinimi ve pahalı olmasıdır (101).

c) Serolojik Tanı: Enzim immunoassay (EIA) ve DFA tanıda kullanılan testlerdir. Potansiyel yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle *C. trachomatis* pozitif EIA sonuçlarını doğrulamaya yönelik blokan antikorlu sistemler geliştirilmiştir (85).

Direkt floresan antikor testinde, örnek lam üzerine yayılır ve floresanla işaretlenmiş antikorlar klamidyal yüzeye bağlanarak floresan mikroskopla incelenir. Burada antijenle konjuge edilmiş antikorlar LPS ya da MOMP yapılarına bağlanır. Direkt floresan antikor testi bazı laboratuvarlarda doğrulama testi olarak da kullanılmaktadır. Enzim immünoassayde de olduğu gibi antiLPS antikorlar *C. pneumoniae*, *C. psittaci*'ye ait LPS'ler ile çapraz reaksiyona girebilir, ancak DFA'da *C. trachomatis*'e özgül anti-MOMP monoklonal antikorları oldukça yüksek spesifite gösterir (102).

Antikora yönelik serolojik testlerin okülojenital klamidyal infeksiyonların tanısında sınırlı tanısal değeri vardır. Serum ve salgısal örneklerde saptanan antikor pozitifliği sıklıkla geçirilmiş infeksiyonu göstermekle birlikte, akut ve geçirilmiş infeksiyon arasındaki ayırımı yardımcı olamamaktadır (103).

d) Moleküler Tanı: Günümüzde klinik numunelerden elde edilen *C. trachomatis* DNA/RNA'larının hedef bölgeleri çoğaltılmak suretiyle bazı nükleik asit amplifikasyon testleri ve "in-house" PZR çalışmaları tanısal alanda kullanılmaktadır (104). Kolay uygulanması, %90'ın üzerinde duyarlılık ve kültüre yakın özgüllüğü (%99-100) ile günümüzde giderek kullanımı artmakta olan PZR, *C. trachomatis* tanısında altın standart

olmaya aday olup birçok laboratuvarında referans yöntem olarak kabul edilmektedir (101, 105, 106).

“Food and Drug Administration” (FDA)’ın *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* tanısında nükleik asit amplifikasyon testleri için önerdiği numuneler; endoservikal ve üretral sürüntü ve idrar örnekleridir (101).

Nükleik asit amplifikasyon testleri için major hedef sekanslar kriptik plazmid üzerinde yer alıp, her *C. trachomatis*’te organizmasında yaklaşık 10 kopya halinde bulunmaktadır (107). Teorik olarak bu plazmidin hedef DNA olarak kullanılması tek kromozomal gen bölgesi olan OMP 1 genine oranla daha spesifiktir (108). Bununla birlikte nadir vakalarda plazmid taşımayan *C. trachomatis* varyantlarının varlığı da bildirilmiş olup hedef DNA olarak plazmid seçildiğinde tanı koyulamayabilir (109). Ligaz zincir reaksiyonu (LZR) ise kriptik plazmid saptamasında artık kullanılmamaktadır. PZR, LZR ve ticari nükleik asit amplifikasyon testlerinin performansları karşılaştırıldığında sensitivite ve spesifitelerinin oldukça benzer olduğu görülmüştür (105). Gen-Prob çalışmalarında ise her bir klamidya organizmasında yüzlerce kopyası bulunan spesifik 23S rRNA hedefini saptamayı amaçlayan transkripsiyon aracılı çoğaltma (transcription-mediated amplification-TMA) kullanılır. Gen-Prob TMA çalışması, LZR ve COBAS Amplicor çalışması ilk akım idrarda *C. trachomatis* saptanması konusunda karşılaştırılmış ve sonuçlar hücre kültürü ile karşılaştırıldığında bu üç ticari teknik arasında belirgin farklılık saptanmamıştır (110). Ayrıca klinik örneklerde *C. trachomatis* 16S rRNA’sının saptanmasını hedefleyen “nükleik asit sekans temelli amplifikasyon” (NASBA) ve OMP 1 geninin saptanmasına yönelik “real-time” PZR de geliştirilmiştir. *Chlamydia trachomatis*’in görüntülediği testler karşılaştırıldığında nükleik asit amplifikasyon testlerinin diğer yöntemlere göre daha sensitif olduğu belirlenmiştir (105, 111-117). Nükleik asit amplifikasyon testlerinin dezavantajı ise örneklerin amplifikasyon inhibitörleri içermesinden meydana gelebilecek yalancı negatif sonuçlardır (101).

2.2.2. *Neisseria gonorrhoeae*

Zorunlu insan patojeni olan *N. gonorrhoeae*; *Neisseriaceae* ailesinin *Neisseria* cinsine ait bir üyedir. Temelde iki patojen *Neisseria* türü olan *N. gonorrhoeae* ve *N.*

meningitidis genetik ve morfolojik olarak oldukça benzerdirler. Bununla birlikte moleküler, hücresel ve biyokimyasal farklılıklar bu iki türün farklı hastalıklara yol açmasını açıklayabilir (118, 119). *Neisseria gonorrhoeae* sıklıkla ürogenital sistemde kolonize olup, gonoreye neden olurken *N. meningitidis* boğaz ve üst solunum yollarında kolonize olup menenjit ve/veya sepsisemiye neden olur.

2.2.2.1. *N. gonorrhoeae*'nin Mikrobiyolojik Özellikleri

Neisseria gonorrhoeae; hareketsiz, sporsuz, Gram negatif boyanan, oksidaz ve katalaz pozitif kapnofilik diplokoktur (120). Oldukça dayanıksız olan bu bakteriler kuruluk, ısı, güneş ışığı, dezenfektanlar, düşük yoğunlukta anyon varlığında hızla ölürler. Bu nedenle hasta örnekleri acilen uygun ortamlara ekilmelidir. Gonokoklar 55°C'ye 5 dakika, %1'lik fenole de 1-2 dakika dayanırlar (121).

Adi besiyerlerinde üretilmeyip "Thayer Martin", "Newyork City" agar ve çikolatamsı agar gibi zenginleştirilmiş, antibiyotik katkılı besiyerlerinde üretilbilirler. Anilin boyaları ile kolay boyanırlar. Optimum üreme ısısı 37°C olan gonokoklar ilk kültürde çok yavaş üreme eğilimindedirler. Aerob olmalarına karşın organizmadan ayrıldıklarında %5-10 CO₂'li ortama ihtiyaç duyarlar. Üretilmesi için ortamda yeterli nemin olması gereklidir. Gonokoklar; selektif besiyerinde üreyebilmeleri, maltoz, sükroz ve laktoza etki etmeyip glukozu fermente etmeleri, nitratı redükte edip düşük ısıda da üreyebilmeleriyle diğer *Neisseria*'lardan ayrılırlar (122-125).

Koloni morfolojisi; bazı dış membran proteinleri ile piluslarının varlığına ve virulansına bağlı olarak değişmektedir. Tip 1'den Tip 5'e kadar değişen koloni tipleri mevcuttur. Patolojik materyallerden izole edilenler ya Tip 1 ya da Tip 2 kolonilerdir (122-124).

Neisseria gonorrhoeae suşları bir kriptik plazmid, birkaç β-laktamaz kodlayan plazmid (TEM 1 β laktamaz) ve farklı konjugatif plazmidleri bünyesinde barındırabilir. Transformasyon ve konjugasyon gibi horizontal genetik aktarım; kommensal *Neisseria*'lar ve *N. meningitidis*'te olduğu gibi sıklıkla *N. gonorrhoeae* suşları arasında da izlenir (126-129).

Çeşitli yollarla meydana gelen horizontal genetik aktarımlar sonucu oluşan mutasyonlar yüksek oranda genotipik ve fenotipik çeşitliliğe yol açar. Bu durum konak immün sisteminden kaçış ve adaptasyonda oldukça önemli olup antibiyotik direnç mekanizmalarının gelişmesi ve yayılımına da imkan sağlar. Bu gelişmeler bakterinin konağa ciddi zarar vermeden konakta persistan olabilmelerini, belirtilerin yokluğunu veya azlığını da açıklayabilir. Dolayısıyla bu kadar yüksek oranda çeşitlilik gösteren bir patojenin tanımlanmasında gerekli ve yeterli yöntemlerin kullanılmasının önemi ortadadır (130).

2.2.2.2. Antijenik Özellikleri

Neisseria gonorrhoeae'nin antijenik yapısı oldukça karmaşıktır. Yüzeyinde üç antijenik yapısal grup bulundurulur. Bunlar:

1-Pilus antijenleri: Pilus, pilin adı verilen benzer protein alt ünitelerinden oluşmuştur. *Neisseria gonorrhoeae*'nin pilileri serolojik olarak heterojen olup antijenik varyasyona uğrarlar. Piluslar konak mukozal hücrelerine adezyonda rol oynar ve bakteriyi fagositozdan korurlar. Mukozal yüzeylere bağlanmaya aracılık edişi ve antifagositik olmasından ötürü pilus *N. gonorrhoeae*'nin en önemli virulans faktörüdür. Pilus bulunduran suşlar genel olarak virulan, pilus bulundurmayan suşlar ise avirülandır.

2-Lipopolisakkarit-Lipooligosakkarit (LOS): Dış membranda bulunan LOS'ler, enfeksiyona karşı bağışıklık yanıtında önemlidir. Serumun, bakterisidal işlevi ile ilişkili esas yüzey antijenidir. *Neisseria gonorrhoeae* LOS'lerinde, LPS'lerde görülen tekrarlayan O antijenik yan zincirleri yoktur, bu nedenle de molekül ağırlığı daha düşüktür. Gonokokal enfeksiyonlardaki toksisite daha çok LOS'in endotoksik etkilerine bağlıdır.(131, 132)

3- Dış Membran Protein Bileşenleri:

Dış membranı %60 oranında proteinler tarafından oluşturulan *N. gonorrhoeae*'nin hücre duvarı birkaç tür protein içerir.

a)Protein I (Porin-por proteini): Protein I'in moleküler ağırlığı ile *N. gonorrhoeae*'nin neden olduğu hastalık tipi arasında bağlantı bulunmuştur. Düşük moleküler ağırlıklı Protein I taşıyan *N. gonorrhoeae* suşları serumun öldürücü etkisine

dirençli olup dissemine infeksiyona neden olurlar. Yüksek molekül ağırlıklı Protein I taşıyanlar ise genellikle semptomatik genital infeksiyonlar yaparlar (123, 124, 133). Protein I antijenik olarak stabil olup buna karşı geliştirilen monoklonal antikor kullanılarak serotiplendirme yapılır (131, 132).

b)Protein II (Opa proteini): *Neisseria gonorrhoeae* kökenlerinin birbirlerine ve hücre yüzeyine yapışmasında rol oynar. Bu proteini içeren kökenler genellikle opak koloni oluştururlar.

c)Protein III (Rmp-Redüksiyon yapabilen protein): Protein I ile birlikte por oluşumunda rol oynarlar. IgG blokan antikorlarının esas bağlanma bölgesini oluştururlar. Tekrarlayan infeksiyonlarda önemlidir. (123)

d)Protein H8: Aşı geliştirme çalışmalarında yararlanılabilecek bu yapılar, *N. gonorrhoeae* ve *N. meningitidis*'te görülürken diğer *Neisseria* türlerinde bulunmazlar (123, 124, 133).

e)Demir düzenleyici protein: Demir depoları azaldığında salınan bir proteindir (134). Demir düzenleyici proteinler; transferrin ve laktoferrinden *in vivo* demir eldesinden sorumlu olup non-patojen suşlarda bulunmazlar. Farklı gonokokal suşların virülansı, mukozal yüzeylerdeki laktoferrinden demiri serbestleştirebilmesiyle ilişkilidir (135, 136).

f)IgA proteaz: Mukozal IgA'yı inaktive eder. Görevi, mikroorganizmayı mukozal yüzeylerdeki salgısal IgA'dan korumak olan bu protein *N. gonorrhoeae* ve *N. meningitidis*'te bulunup patojen olmayan *Neisseria*'larda bulunmaz (135).

2.2.2.3. *N. gonorrhoeae*'nin Epidemiyolojisi

Gonore, 1955'ten 1970 sonlarına kadar devamlı bir artış göstermiş, son yıllarda ise görülme sıklığında azalma saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasında ilk sırada yer almaktadır. Korunma ve antibiyotiklerin rutin kullanımının artması nedeniyle gerçek rakamların bildirilenin iki katı olduğu düşünülmektedir (121). Ülkemizde hastalığın sıklığı ile ilgili çok fazla yayın olamamakla birlikte 1994'te 391 vajinal akıntılı kadının dahil edildiği bir araştırmada %1,7 sıklıkta,

1998’de ise 63 hayat kadını üzerinde yapılan bir araştırmada %6 sıklıkta gonore saptanmıştır (137).

Gonore görülme sıklığı çeşitli gruplar arasında farklılıklar göstermekle birlikte 24 yaş altı, çok eşli, korunma yöntemi kullanmayan, alt gelir grubundan, bekar kişiler ve hayat kadınları gonore açısından risk altındadır. Tedavinin ucuz ve kolay olmasına rağmen gonorenin hala sorun olmasının en önemli nedeni asemptomatik taşıyıcılığın sıklığıdır. Gonoreli olduğu bilinen eşlerle ilişkiye girmiş erkeklerde yapılan araştırmalarda asemptomatik infeksiyon oranı %40-79, kadınlarda ise %90 olarak bildirilmiştir. Bu olgular hastalığın yayılma nedenidir. *Neisseria gonorrhoeae*’nin ana bulaşma yolu her türlü cinsel ilişki olmakla birlikte; cinsel taciz, doğum sırasında enfekte anneden bulaş da olabilir. Gonore’nin enfekte kadından erkeğe tek cinsel ilişki ile bulaşma oranı %35 iken; enfekte erkekten kadına tek cinsel ilişki ile geçme oranı %50-60 olarak bildirilmiştir. Bu açıdan taşıyıcıların saptanması, uygun tanı ve tedavi yöntemlerinin uygulanması, partner tedavisi ve bunların uygulanabilmesi için halkın eğitimi en önemli mücadele yöntemidir (123, 133).

2.2.2.4.  rnek Toplanması

Gonore tanısı için infeksiyonun klinik özelliklerine uygun materyal alınması gerekir. Bu amaçla üretral akıntı, endoservikal sürüntü, konjuktival akıntı, kan, anorektal sürüntü örnekleri kullanılır. Son yıllarda kadınlarda vulvovaginal sürüntü ile her iki cinsiyet grubundaki hastalardan alınan ilk idrar örneklerinin, özellikle nükleik asit amplifikasyon bazlı testler için en az diğer örnekler kadar kaliteli ancak daha az invaziv ve daha konforlu olması sebebi ile tercih sebebi olduğu bildirilmiştir (123, 138).

Çevresel şartlara oldukça dayanıksız olduğu bilinen bu bakterilerin uygun tanısının konulabilmesi için hasta örneklerinin acilen laboratuvara ulaştırılması ve uygun ortamlara ekilmesi gerekmektedir.

2.2.2.5. *N. gonorrhoeae*'nin Laboratuvar Tanısı

a) Mikroskopik İnceleme: Gonokok infeksiyonlarının tanısında boyalı preparatlar, özellikle semptomatik hastalarda yaklaşık %98 duyarlılığa sahiptir. Basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir (139). Yapılan incelemelerde polimorfonükleer lökositler ve bunların sitoplazmalarında veya dışında izlenen Gram negatif, kahve çekirdeği görünümlü diplokokların izlenmesi klinik bulgularla birlikte tanıya yönlendirebilir (125).

b) Kültür ve Serolojik Yöntemler: Güç üreyen *N. gonorrhoeae*'nin tanısında kültür altın standarttır. Bununla birlikte yeterli miktarda sürüntü alınması, örneğin uygun taşıyıcı besiyerinde laboratuvara ulaştırılması ve laboratuvara getirilme süresinin kısa tutulması oldukça önemlidir. Ek olarak örneğin, optimal koşullarda selektif ve selektif olmayan besiyeri kombinasyonuna inokülasyonu ve inkübasyonu da oldukça önemlidir (140-143).

Şüphelenilen koloninin identifikasyona yönelik ön tanı, tipik morfoloji, pozitif oksidaz reaksiyonu, mikroskopide Gram negatif diplokokların izlenmesini takiben karbonhidrat oksidasyonu gibi biyokimyasal testler ve hızlı enzim-substrat testleri, spesifik *N. gonorrhoeae* rRNA'sını hibridize eden kemiluminesant DNA prob tekniği, koaglutinasyon testleri ve monoklonal floresan antikor testleri gibi serolojik testlerle konabilir (140, 142-145).

Gonore tanısında farklı antijen saptama teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar hızlı, uygulaması kolay, canlı organizma gerektirmeyen ve üretral/servikal akıntı ve idrar için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek testlerdir (146).

Uygun koşullarda *N. gonorrhoeae* tanısında kültür; pek çok örnek türü için uygun ve ucuz olmakla birlikte yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptir. Ayrıca kültür, antibiyotik duyarlılık testine ve *N. gonorrhoeae* suşlarının tanımlanmasına imkan sağlar ancak zaman alıcıdır (85).

c) Moleküler Yöntemler:

Neisseria gonorrhoeae identifikasyonuna yönelik pek çok DNA/RNA bazlı nükleik asit amplifikasyon testleri geliştirilmiştir. Hibridizasyon yöntemleri tanıda yüksek spesifiteye sahipken nükleik asit amplifikasyon testlerine göre daha düşük spesifiteye

sahiptir. Son yıllarda farklı PZR teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar; Rmp (reduction-modifiable protein) (147) gibi *N. gonorrhoeae*'ye spesifik membran proteinlerini kodlayan kromozomal genleri, 16S rRNA genini, kromozomal sitozin DNA metil transferaz genlerini (148, 149) ve kromozoma entegre olabilen kriptik plasmid içinde lokalize cppB genini saptamakta kullanılmaktadır (150). *Neisseria gonorrhoeae*'nin kromozomal pilin ve opa genlerini saptamada LZR kullanılmış olup günümüzde pek çok tanısal laboratuvarında kullanılmaktadır (151, 152).

Nükleik asit amplifikasyon testleri pek çok örnek tipi açısından (özellikle rektal ve faringeal örneklerde) kültüre oranla daha yüksek spesifiteye sahiptir (105, 153). Kommensal *Neisseria*'lara bağlı yanlış pozitif sonuçlar olabilmekle birlikte, bu durum sonuçların iyi yorumlanması ve orjinal materyalin yeniden çalışılması ile aşılabilecek bir sorundur (154).

2.3. *Mycobacterium tuberculosis*

Tüberküloz, insanlık tarihinin en eski hastalıklarından biri olup, Robert Koch'un 1882'de tüberkülozun, *Mycobacterium tuberculosis* tarafından oluşturulan bir infeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlaması ile hastalığın tanımlanmasında dönüm noktası yaşanmıştır (155).

Gelişmiş ülkelerde insidansı giderek azalan tüberküloz, üçüncü dünya ülkeleri olarak tanımlanan gelişmekte olan ülkelere hala önemli bir sağlık problemidir. Hastalığın insidansında, 1950'lerden sonra kemoterapideki gelişmeler ışığında, %14-20 oranında bir azalma gözlenmesine rağmen, 1985'lerde evsizlik ve HIV/AIDS birlikteliği ile yeniden, üstelik çoklu ilaca dirençli olgularla karşımıza çıkmaya başlamıştır (156, 157).

Tüberküloz, temelde solunum yolu hastalığı olmakla birlikte hastaların %20'si ekstrapulmoner hastalıklara ait belirtilerle kliniğe başvurur. Genitoüriner sistem tüberkülozu en sık rastlanan ekstrapulmoner hastalık olmakla birlikte toplamda hastaların %4-8'ini oluşturur (158). Hastanın öyküsünden tanıya gitmek zor olsa da, radyolojik görüntüleme, kültür ve PZR tanı koymada yardımcı olur. Erkek ve kadın infertilitesi

etiolojisinde de yer alan hastalıklardan biri olan genitoüriner tüberkülozun tanısının konması ve tedavi edilmesi toplumsal açıdan önem arz eder (159).

2.3.1. *Mycobacterium tuberculosis*'in Mikrobiyolojik Özellikleri

Mikobakteriler, 0.2-0.6 µm en ve 1-10 µm boyunda, aerop, sporsuz, hareketsiz, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Mikroskopik olarak dallanmış, uzun filamentöz veya kokoidal formda görülebilirler. Klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda tekli, ikili veya üçlü gruplar halinde ve birbirine paralel ya da uçlarından birbirlerine yaklaşıp X, V, L harfleri oluşturacak şekilde bir arada görülebilmekle birlikte, besiyerinde oluşturdukları kolonilerden yapılan preparatlarda gruplar şeklinde görülürler. Hücre duvar yapıları Gram pozitif bakterilerinki ile benzerlik göstermesine rağmen, hücre duvarlarının yüksek oranda lipid içermesi nedeniyle Gram, Giemsa gibi rutin boyama yöntemleriyle boyanmazlar. Boyayı alabilmeleri için ısıya maruz bırakılmaları ve aldıkları boyayı asit-alkol ile yıkanmalarına rağmen bırakmamaları nedeniyle aside rezistan bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar (160-162).

Mikobakterilerin ikiye bölünme süresinin ortalama 18-24 saat olması nedeniyle *M. tuberculosis*'in standart kültür ortamında üremesi ortalama 4-6 haftada gerçekleşir. Olumsuz çevre koşullarına oldukça dayanıklı olan mikobakteriler, bu koşullarda uzun süre canlılığını sürdürebilir. Aerop olan bu mikroorganizma +4°C'de haftalarca, -70°C'de ise yıllarca canlılığını koruyabilmesine karşın, 60°C'de 20 dakikada, 70°C'de 5 dakikada ölür (163). *Mycobacterium tuberculosis* için optimal üreme ısısı 37°C olup bu ısı; *M. ulcerans*, *M. marinum* ve *M. haemophilum*'da 30-32°C, *M. xenopi*'de ise 42°C'dir. Katı besiyerlerinde bazı türler R (*M. tuberculosis*) tipi, bazıları ise S (*M. avium intracellulare*) tipi koloni oluşturmakla birlikte, bazı türlerin pigment üretme özelliği vardır. Standart kültür ortamlarında 10-15 günde gözle görülür koloni oluşturup yumurtalı besiyerinde (Lowenstein-Jensen) optimal ısıda, pH 6,5-6,8'de ve %5-10 CO₂'li ortamda *M. tuberculosis* daha kolay ürer (160).

Hücre duvar yapısı, diğer bakterilerden belirgin olarak farklılık gösteren *M. tuberculosis* yüksek oranda lipid içerir. Her ne kadar hücreye şeklini peptidoglikan tabakası

veriyorsa da, bu tabakanın üzerinde yer alan ve mikolik asit esterlerini taşıyan lipoarabinogalakattan tabakasının esas olarak hücre geçirgenliğinin sınırlandırılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Başlangıçta sadece *M. tuberculosis* türünde gözlemlenen; basillerin düzensiz kümeleşmesi veya birbirine paralel dizilim oluşturacak şekildeki üreme özelliği, daha sonraları başka mikobakteri türlerinde de görülmüştür. Bu tip üremeden kord faktörü ve mikolik asit içeren makromoleküllerin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Mikolik asitler, mikobakteriyel hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini, hücre lipidlerinin ise %60'ını oluşturur (164, 165).

2.3.2. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Yunanca mantar (myces) ve küçük çubuk (bacterion) kelimelerinden türetilen *Mycobacterium*lar; isminin mantar kısmını, sıvı besiyerlerinde üreme özelliklerinin küflere benzemesi dolayısıyla almıştır (166). *Actinomycetales* takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinin *Mycobacterium* cinsine ait bakterilerin temel özellikleri, yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları, hücre duvarlarında bol miktarda lipid olması ve genomlarında %59-65 oranında G+C bulunmasıdır. *Mycobacterium* cinsi içerisinde başlıca iki patojen bulunmaktadır. Bunlar; *M. tuberculosis* (Koch, 1882) ve *M. leprae* (Hansen, 1874)'dır (167, 168).

Mycobacterium tuberculosis complex haricindeki tüm mikobakteriler, tüberküloz dışı mikobakteriler “*Mycobacteria other than M. tuberculosis* (MOTT)” olarak adlandırılırlar. *Mycobacterium tuberculosis* dışındaki diğer mikobakterilerin görülme sıklığının artması üzerine 1950'li yıllarda Ernest Runyon, bu atipik mikroorganizmaları üreme hızı ve pigment üretimlerine göre dört gruba ayırmıştır (Fotokromojen, Skotokromojen, Non-fotokromojen, Hızlı üreyenler) (169).

2.3.4. Antijenik Özellikleri

Mikobakterilerin hücre duvarındaki lipid ve proteinler, basilin virülansında ve dirençliliğinde önemli role sahiptir. Hücre duvarındaki bu lipidlerden bazıları;

a) Mikolik asit: 78-90 karbonlu uzun zincirli yağ asiti olan mikolik asit bakteriye aside dirençlilik kazandıran kısımdır.

b) Balmumu (Waxes D): Freud adjuvanındaki aktif kısmı oluşturur.

c) Kord faktörü (6,6'-dimikolat-a-D trehaloz): Virölans ve immünite ile ilişkisi mevcut olan kord faktörü lökositlerin göçünü önleyerek kronik granülom oluşumunu sağlar.

d) Fosfolipidler: Fosfatidik asid temel yapısındaki fosfatidilgliserollerdir. Bunlar kazeifikasyon nekrozundan sorumludurlar (170).

e) Sülfatidler-Muramil dipeptid: Basilin virölansından sorumlu olup mikolik asitle kompleks oluşturup granülom oluşumunda rol oynarlar. Fagolizozom oluşumunu engelleyerek, basilin parçalanmasını ve konak tarafından yok edilmesini önlerler (171).

Mikobakterilerin hücre duvarı proteinlerinin hücreyel immün yanıt oluşumunda rolleri büyüktür. Bunlardan Old Tüberkülin (OT); tüberkülin deri testinde kullanılan temel protein olup bunların saflaştırılması ile pürifiye protein deriveleri (PPD) oluşur. PPD, Wax D ile kombine edilip organizmaya verildiğinde tüberkülin reaksiyonu oluşturur. Antijen 5, antijen 6, antijen 60 ise bakteriye karşı gelişen hümoral cevabın gösterilmesinde kullanılıp PPD'den daha özgülüdür (172, 173).

Hücre duvarındaki polisakkaritlerin (arabinogalakattan ve arabinomannan) ise erken aşırı duyarlılık reaksiyonunu başlattıkları bilinmekle birlikte hasta serumu ile etkileşerek antijenik özellik gösterdikleri de bildirilmiştir (174).

2.3.5. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Tüberküloz insidansı sosyoekonomik düzeylerine göre ülkeden ülkeye değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde tüberküloz insidansı çok düşük olmasına rağmen, geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelere çok yüksektir. Gelişmiş ülkelere tüberküloz sıklıkla yaşlılarda görülürken, gelişmemiş ülkelere durum tam tersidir. Göçmenler, diabet, alkolizm, bakım evlerinde yaşayanlar, immün supresif tedavi alanlar ve AIDS gibi risk faktörleri insidansı artırmaktadır (157, 175).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünya nüfusunun üçte biri tüberküloz basili ile enfektidir. Her yıl yaklaşık 8 milyon yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmakta ve 3 milyon hasta tüberküloz sebebiyle ölmektedir. 2009 yılında 9.4 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıkmış, 1,7 milyon insan tüberkülozdan ölmüştür. 2015 yılına kadar hasta sayısının 15 milyona ulaşacağı, bunların üç milyonunun HIV enfeksiyonu ile birliktelik göstereceği tahmin edilmektedir (176, 177).

Dünya Sağlık Örgütü, 1993 yılında tüberküloz konusunda dünya genelinde acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelere “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi’ni” (DGTS) önermiştir. Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi bugün 190 ülkeye yayılmış olmakla birlikte, bu ülkeler dünya popülasyonunun %93’ünü ve tahmini tüberküloz olgularının %99’unu içermektedir. Ayrıca, yayma pozitif olguların %70’ine tanı koymayı ve bu olguların %85’inin başarı ile tedavi edilmesini hedef olarak belirlemiştir. “Milenyum Gelişme Hedefi” adı verilen bu hedefle aynı zamanda 2015 yılına kadar prevalans ve ölüm oranlarının yarıya indirilmesi amaçlanmıştır (176, 177).

DSÖ, tüberküloz kontrolü için, 2002’de daha geniş kapsamlı bir yaklaşım benimsemiş, DGTS’ne ÇİD-TB (Çoklu ilaca dirençli-Tüberküloz), HIV+TB ve başka konuları da eklemiş ve buna “Stop TB Stratejisi” adını vermiştir (178).

Türkiye’de ise, tüberküloz ile ilgili bilinen en yüksek hasta sayıları (ölüm kayıtlarına dayanılarak tahmin edilen sayılar) 1920’li yıllara ait olup 1940’lı yıllarda tüberküloza bağlı ölümler azalmaya başlamıştır. Ancak asıl düşüş ilaç tedavilerinin başladığı 1950’li yıllardan itibaren başlamıştır. Hastalığın sıklığı 1960’lı yıllarda 170/100000 iken 1970’li yıllarda olgu hızı azalmıştır. Bu yılları takiben 1980’lerden sonra olgu hızı yeniden artmaya başlamış ancak, 1990’larla beraber yeniden vaka sayısında düşme izlenmiştir (176).

Verem savaşı dispanseri kayıtlarına 2008 yılında 18.452 tüberküloz hastası girmiş, toplam olgu hızı yüz bin nüfusta 27,9’dan 25,8’e (%7,5) düşüş göstermiştir. Hastaların 11.476’sı (%62,2) erkek, 6.976’sı (%37,8) kadın olup erkek/kadın oranı 1,6’dır. Olgu hızı erkeklerde 100000’de 32,0; kadınlarda ise 100.000’de 19,6’dır. Olgu hızının yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan itibaren olgu hızının arttığı, 55-64 ile 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye ulaştığı izlenmiştir. Türkiye’de tüberküloz insidansı,

yıllara göre azalmakta olup 2002 yılında yüz binde 40 iken 2008 yılında yüz binde 30'dur (124).

2.3.6. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı

Tüberkülozun ön tanısı klinik verilere dayanmakla birlikte kesin tanısı mikrobiyolojik yöntemlerle konmaktadır. İnfeksiyon yerine göre değişmekle birlikte, tanıda sıklıkla kullanılan örnekler; balgam, bronkoskopik aspirasyon numunesi, gastrik lavaj, idrar ve BOS'tur (179).

a) Örneklerin işlenmesi: Klinik örnekler steril (BOS, plevra sıvısı) ve steril olmayanlar (flora içeren örnekler) olarak ikiye ayrılıp steril olmayan örnekler organik kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemlerine alınırlar. Steril örnekler ise 3500xg'de 20 dakika santrifüj edilip mevcut çökelti mikroskopik inceleme ve kültür için kullanılabilir.

Homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işleminde sıklıkla N-Asetil-L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) veya tek başına NaOH (%3-4) kullanılmakla birlikte; zefiran-trisodyum fosfat, oksalik asit, setilpridinyum klorid ve sodyum klorid gibi farklı kimyasallardan da yararlanılabilir (180).

2.3.6.1. Mikroskopik İnceleme: Hücre duvarlarındaki uzun zincirli yağ asitleri (mikolik asitler) nedeniyle Gram boyamada kullanılan boyalara karşı geçirgenliği sınırlı olan mikobakteriler; Gram boyamada genellikle silik boyanmış, boncuklu Gram pozitif basiller (dekolorizasyona dirençli) şeklinde görülürler. Bu nedenle örneklerde aside dirençli boyama yöntemi uygulanır (181).

Yaymanın duyarlılığı %22-80 arasında değişmekle birlikte; örneğin tipi, etken olan mikobakteri türü, dekontaminasyon ve kontaminasyon işleminin yeterliliği, boyama tipi, yaymanın kalınlığı ve yaymayı inceleyen laboratuvar personelinin deneyimi boyanın duyarlılığını etkileyen faktörlerdir (182).

a)Boyama yöntemleri

i)Karbolfuksin metodu (Ziehl-Neelsen, Kinyoun): Bu yöntemde fuksin ve fenol (karbolik asit) bileşimi kullanılır. Boyama işlemi sonrasında aside dirençli organizmalar kırmızı renkte görülür. Ziehl-Neelsen ve Kinyoun yöntemi arasındaki temel farklılıklar fenol konsantrasyonu ve uygulama biçimi olup; Kinyoun yönteminde ısıtma yerine boya konsantrasyonu daha yoğun hazırlanır. Bu iki yöntem sonrasında mikobakteriler, kullanılan zıt boyaya göre (sıklıkla metilen mavisi), mavi veya yeşil zeminde kırmızı basiller olarak görülürler (183).

ii)Florokrom metodu (auramin O, auramin-rhodamin): Florokrom boyamada ana ilke fenollü fuksin yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Aside dirençli organizmalar ışık mikroskopu altında sarı-turuncu renkte floresan verirler. Boyaların hazırlanması, amaçlanan hedef (doku, mikroorganizma, antijen antikor kompleksi vs.) ve boyama işlemi sırasında ısı-süre değişikliklerinin uygulanmasına göre farklı floresan boyama yöntemleri mevcut olup bunlara; Auramin-Fenol, Auramine-Rhodamine, Truant'ın modifiye Auramine-Rhodamine boyama yöntemi ve Glikerson ve Kanner'in floresanlı boyama yöntemi örnek verilebilir (183).

2.3.6.2. Kültür: Mikroskopik inceleme tüberküloz tanısı için değerli, basit ve ucuz bir yöntem olup ön tanı değeri taşır ancak tüberkülozun kesin tanısı için etkenin üretilmesi gerekir. Bu nedenle kültür; *M. tuberculosis* tanısında 'altın standart' yöntemdir.

Mikobakteri izolasyonu için kullanılan besiyerleri, katı ve sıvı besiyerleri olarak ikiye ayrılırlar. Sıvı besiyerlerine Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween albumin sıvı besiyerleri örnek verilebilirken katı besiyerleri yumurta ve agar bazlı olarak ikiye ayrılır. Yumurta bazlı besiyerlerine, Lowenstein-Jensen, Petragani ve American Thoracic Society Medium; agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 örnek verilebilir (184).

Koloniler; yumurta bazlı besiyerlerinde 18-24 günde görülebilir hale gelirken; agar bazlı besiyerlerinde 10-12 günde mikroskop altında görülebilir. Amerikan Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in izolasyon ve identifikasyonu için gerekli sürenin 14-21 gün ile sınırlandırılmasını önermektedir. Bu sebeple tüberküloz

basilinin üremesinin erken dönemde tespitini amaçlayan hızlı kültür sistemleri geliştirilmiştir (183, 185).

Sıvı besiyerlerinin kullanıldığı kültür sistemleri katı besiyerlerinden daha iyi sonuç verdiği için bu besiyerlerinin kullanıldığı bir çok ticari hızlı tanı yöntemi geliştirilmiştir. Bunlardan BACTEC 460TB sistemi hızlı, yarı otomatize; izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık testlerinin uygulandığı bir sistemdir. Besiyerinde üremeyi tespit için ^{14}C işaretli palmitik asit bulunur. Palmitik asit mikroorganizma tarafından kullanıldığında ortaya çıkan $^{14}\text{CO}_2$ cihaz tarafından tespit edilir. Sistemin pek çok avantajı olmasına rağmen; kontaminasyon riski, laboratuvar iş yükünün artması, radyoaktif materyallerin temini ve atılması temel dezavantajlardır (183, 186).

BACTEC 460TB'nin dezavantajları MGIT 960 sisteminde bulunmamakla birlikte bu sistemde oksijen tüketimine bağlı değişen floresans miktarı ölçülür. Kısa sürede sonuç vermesi, radyoaktif madde içermemesi ve üremenin sürekli izlenmesine imkan veren tam otomatize bir sistem olması bu sistemin en önemli avantajlarıdır. BACTEC 900 MB, ESP kültür sistemi II ve MB/BacT ALERT 3D ise diğer sıvı bazlı sistemlerdir (186).

2.3.6.3. Serolojik Tanı: Serolojik testler basit, ucuz ve kolay değerlendirilebilen testlerdir. Özellikle ekstrapulmoner tüberküloz tanısında, çocuklar ve düşkün hastalar gibi örnek almanın zor olduğu durumlarda avantaj sağlamaktadır. Ancak, bu testlerin duyarlılığı yayma pozitif hastalarda yüksek olmasına rağmen, çocuklarda, ekstrapulmoner tüberküloz vakalarında ve HIV ile enfekte kişilerde daha düşüktür (187).

Bunlardan en bilineni Tüberkülin deri testi (Mantoux testi) olup bu testle pürifiye protein derivelerine karşı gelişen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ölçülür. Ön kol iç yüzüne, deri içine 0,1 ml (5 Tüberkülin ünitesi-TU) saflaştırılmış protein enjekte edilip 48-72 saat sonra oluşan endurasyonun çapı ölçülür. BCG aşısı olmayan kişilerde 0-5 mm negatif, 6-9 mm şüpheli ve 10 mm üzeri pozitif kabul edilirken; aşısı olanlarda 15mm üzeri pozitif kabul edilir. Testin pozitif olması, kişinin basil ile enfekte olduğunu gösterir ama hastalığının varlığı ya da yokluğunu göstermez. Bununla birlikte atipik mikobakterilerle enfekte olmuş kişilerde hatalı pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Testle ilgili mevcut sıkıntılar nedeniyle yeni testler geliştirme ihtiyacı duyulmuş ve son zamanlarda

QuantiFERON-TB Gold ve T Spot TB testleri geliştirilmiştir. Bu serolojik testler *M. tuberculosis*'e karşı oluşan hücrel immünite bileşeni olan IFN- γ 'yı ölçer. Tüberküloz deri testi yerine tasarlanmış olan bu testler BCG aşısından daha az etkilenirler (81, 164, 188).

2.3.6.4. Moleküler Yöntemler: Geleneksel tanı yöntemlerinden mikroskopinin duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması ve kültür işleminin uzun zaman alması nedeniyle moleküler tanı yöntemleri bu alanda da kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler klinik örneklerden etkenin kısa sürede tespiti, tanımlanması ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılmaktadır (189).

Uygulamalarda sıkça gözlenebilen kontaminasyon riskini ortadan kaldırabilmek, duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmek için birçok yeni yöntem geliştirilmiş olup bu yöntemlerin en başında nükleik asit amplifikasyon testleri gelmektedir. Bu sistemler IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA ve 23S rRNA'yı hedef alır. Bu yöntemlerden PZR uzun yıllardır mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında ise genellikle 16S rRNA, hps65, rpoB ve daha pek çok gen bölgesi hedef olarak seçilir.

Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya tüberküloz ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamaya yönelik olarak, DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sekans analiz kitleri ve moleküler biyoloji ve bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA mikroarray teknolojisi ürünleri geliştirilmiştir (190). Günümüzde ticari olarak kullanılan moleküler sistemlerin bazıları; *M. tuberculosis* Direct Test (MTD: Gen-Probe, ABD), Cobas Amplicor MTB Assay (Roche Diagnostic System, İsviçre), LCx MTB Assay (Abbott Laboratories, ABD), BD ProbeTec ET (Becton Dickinson Biosciences, ABD), Q-Beta Replicase-Amplified Prob Assay (Downers Grove, ABD), Real-Time PCR MTB Assay (LightCycler-Roche, iCycler-BioRad, ABD), The AccuProbe System (Gen-Probe, ABD), INNO-LIPA Mycobacteria (Innogenetics, Belçika) ve MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (PE AppliedBiosystems, ABD) şeklinde sıralanabilir (190, 191).

Geliştirilen bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi geleneksel yöntemlerin yerini alamamıştır. Bunun başlıca nedenleri, moleküler yöntemlerin genel

pozitiflik oranlarının kültürden anlamlı derecede yüksek olmaması, kontaminasyona dayalı hatalı pozitifliklerin fazla olması, yöntemlerin çoğunun solunum yolu örnekleri için standardize olması ve tedavi altındaki hastaların çıkardığı lü basilin bile pozitif olarak saptanması olarak sıralanabilir (189).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 1 Ocak 2013-31 Aralık 2013 tarihleri arasındaki bir yıllık zaman dilimi içerisinde, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Üroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları birimlerine, üriner sistem enfeksiyonu yakınmalarıyla başvurmuş 6629 kişi dahil edilmiştir.

Çalışmamızda 351 hasta idrarında multipleks PZR yöntemiyle *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae* ve *C. trachomatis*; ‘‘in-house’’ PZR yöntemi ile de *M. tuberculosis* araştırılmıştır.

3.1. Gereçler

a) Cam ve plastik malzemeler:

- Thoma lamı
- Tek kullanımlık eldivenler
- 1 ml’lik enjektörler
- 15 ml’lik falkon tüpleri
- Buz parçalarıyla dolu çukur kap
- Otomatik pipetler
- 10µl, 100µl ve 1000µl’lik filtreli ve filtresiz pipet uçları
- DNAase-RNAase içermeyen eppendorf tüpleri
- Tüpler için tüp stantları

b) Ekipman:

- Mikrosantrifüj (Hettich Zenrtifugen EBA 12R, Germany)
- Termal döngü cihazı (GeneAmp PCR System 9700, A.B.D)
- DNA izolasyonu laboratuvarı ve amplifikasyon laboratuvarında kullanılmak üzere üç adet ayarlanabilir mikropipet (1-20 µl, 20-200 µl ve 200-1000 µl) (Eppendorf, A.B.D).
- Vorteks (karıştırıcı, VF 2500 devir/dakika)
- +4°C ve -80°C soğutucular

3.2. Yöntem**3.2.1. Örneklerin alınması, çalışma için hazırlanması ve saklanması**

1 Ocak 2013 – 31 Aralık 2013 tarihleri arasındaki bir yıl süresince İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Hastanesi, Üroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları bölümleri poliklinik ve servislerinden, üriner sistem enfeksiyonu şüphesi ile gönderilen 6629 idrar numunesi steril piyüri açısından değerlendirmeye alındı.

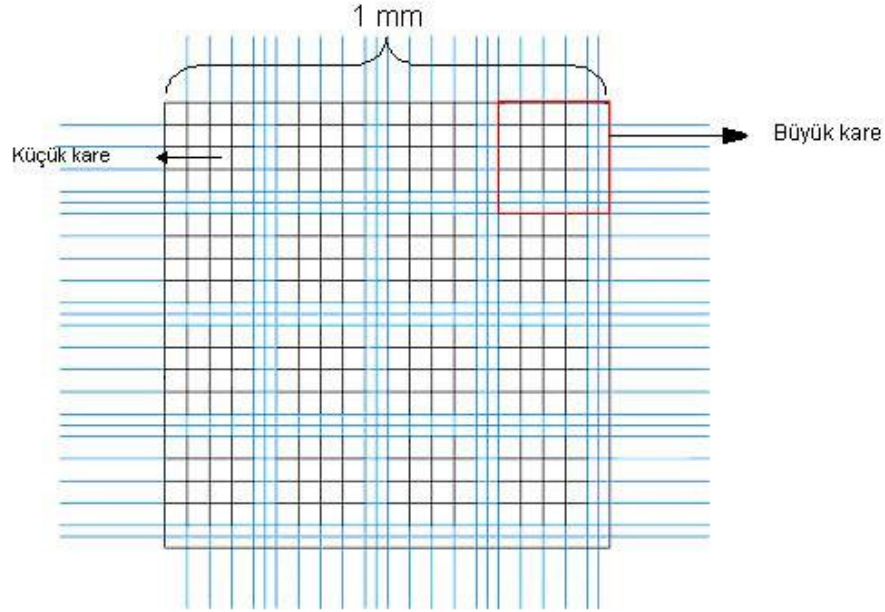
Hastalardan orta akım idrar alınmış olup steril piyüri olduğu tespit edilen idrar örnekleri 15 ml'lik falkon tüplerine 10'ar ml konulup 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatant kısmı dezenfektanlı bir kaba dökülüp dipte kalan 1 ml'lik kısmı ise 2 ml'lik eppendorf tüplere her biri 0,5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Bu örnekler daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.2.2. Steril piyüri tespiti

Laboratuvara gelen idrar örneklerinin, Eozin-Metilen Blue (EMB) agar ve kanlı agara, 0.01 ml kapasiteli özelerle ekimi yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Artan idrar numuneleri ekim işlemi sonrasında thoma lamı ile değerlendirildi. Piyüri saptanan numuneler üreme kontrolü yapılmak üzere +4°C'de 24 saat bekletildi. Thoma lamı ile değerlendirme esnasında; lam üzerinde bulunan iki yandaki çıkıntılar hafifçe ıslatıldıktan sonra lamel bunların arasını kapatacak şekilde oturtulup iki

elin başparmakları ile konsantrik Newton halkaları belirinceye kadar bastırıldı. Bir ml'lik enjektörler yardımıyla alınan idrar örneğinden bir damla, sayım kamaralarının olduğu kenardan lamel-lam arasına damlatılıp sıvı kapillarite sayesinde lam üzerinde bulunan sayım alanına yayıldı. Aktarılan sıvının hareketsizleşmesi için 1-2 dk. beklenip sayım yapılacak çizgili alan bulunmak üzere önce mikroskopun küçük büyütmesinde bakılıp sonrasında da bu karelere düşen lökositleri saymak için büyük büyütmede bakıldı.

Thoma lamının çukur kısmına lamel kapatılıp idrar damlatıldığında 0.1 mm yüksekliğinde sıvı kalır. Bu nedenle Thoma lamı ile 0.1 mm^3 hacimdeki sıvıda hücresel yapı sayımı yapılabilmektedir. Sayım yapılacak alan cam yüzey üzerindeki çizgilerle belirlenmiştir. Thoma lamı sayım alanı şematik görüntüsü şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Thoma lamı sayım alanı.

Thoma lamında 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare bulunup büyük karelerin sınırları ara çizgilerle belirtilmiştir. Küçük kareler gerçekte bir kare prizma olup çukurun derinliği $1/10 = 0.1 \text{ mm}$ 'dir. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi $= 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.00025 \text{ mm}^3 = 1/4.000 \text{ mm}^3$ 'tür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğundan dolayı toplam

sayım hacmi = $0.00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,1 \text{ mm}^3$ tür. Thoma lamında mm^3 'teki sayım $A \times SF \times 10$ formülü ile hesaplanmakla birlikte $A = 16$ büyük karede sayılan lökosit adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. Çalışmamızda idrarı seyreltmeden direk olarak Thoma lamında değerlendirdiğimizden dolayı bizim için formül $A \times 10$ ' dur. İdrarda mm^3 'te 10 lökosit saptanması piyüriyi gösterdiği için Thoma lamında en az 1 lökosit görmemiz yeterli olmuştur.

3.2.3. DNA izolasyonu

Steril piyüri hastalara ait -80°C 'de sakladığımız idrar örneklerinden DNA izolasyonu yapmak için, doku kiti ve otomatize ekstraksiyon cihazı (EZ1, Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Cihazın ve kitin kullanım prosedürüne uygun olarak, santrifüj edilmiş idrar örneğinden 200 µl G2 buffer ile süspanse edilip cihaza yerleştirildi. Kullanılan ticari multipleks PZR kitinin önerisi doğrultusunda 50 µl elüsyon buffer ile cihaz tarafından sulandırılan DNA'lar çalışılincaya kadar -20°C 'de saklandı

3.2.4. Multipleks PZR kiti

Çalışmamızda *M. hominis*, *M. genitalium*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* ve *U. urealyticum* tespiti için Seeplex STD6 ACE Detection V2.0 (Seegene, Seul, Korea) ticari multiplex PZR kiti kullanılmış olup bu kit ile eş zamanlı olarak saptanabilmektedir.

Kit içeriği:

- Primer-5X STD6 ACE PM
- Premix-2X Multipleks master miks
- Marker- STD6 ACE Marker
- İnternal kontrol (IC)
- Pozitif kontrol (PC)
- Negatif kontrol (NC)
- 8-MOP solüsyonu (kontaminasyonun önlenmesi)

3.2.5. Amplifikasyon aşaması:

Reagentlar, buz üzerinde çözündürülmelerinin ardından vortekslenip, kapak içinde kalabilen damlacıklar için kısa bir süre santrifüj edildi.

PZR inhibisyonunun kontrolü için internal kontrol; DNA izolasyonu aşamasında eklendi.

PZR mastermiks hazırlama:

4 µl 5X STD6 ACE PM

3 µl 8-MOP Solüsyonu

10 µl 2X multipleks mastermiks

17 µl PZR mastermiks toplam volümü (her bir örnek için)

Hazırlanan mastermiks vortekslenip, kısa bir süre santrifüj edilerek mastermiksın karışması sağlandı. Karışım 0.2 ml'lik PZR tüplerine 17'şer µl dağıtılıp her bir örnek için 3'er µl ekstraksiyon ürünü eklendi.

17 µl PZR mastermiks

3 µl Örnek nükleik asiti

20 µl Toplam reaksiyon volümü

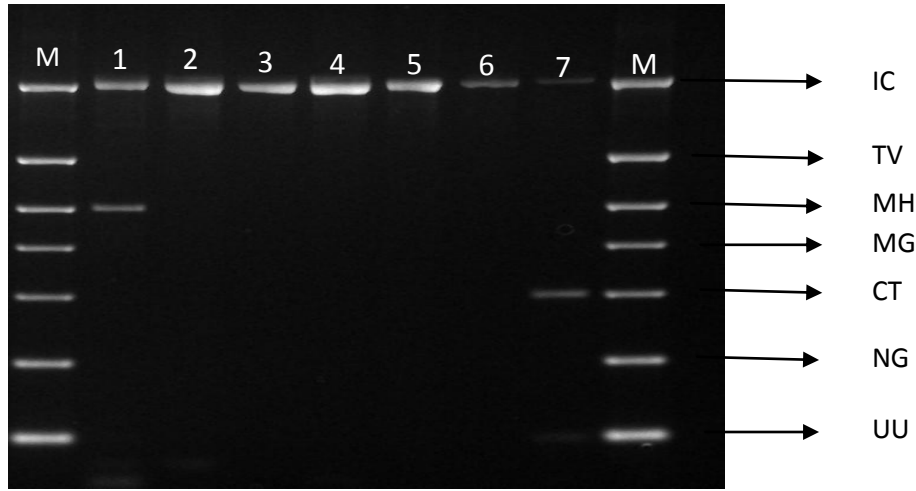
Negatif kontrol için 3 µl STD6 ACE NC, pozitif kontrol için ise 3 µl STD6 ACE PC eklendi. PZR mastermiksının ve hasta örneğininin pozitif kontrol ile kontaminasyonundan kaçınılarak hazırlanan ürünler önceden 94°C'ye kadar ısıtılmış termal döngü cihazına yerleştirildi. Tablo 2'de tanımlanan ısı ve süreler kullanılarak PZR işlemi uygulanıp jel elektroforez uygulamasına kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 2. Kullanılan kitin termal döngü cihazı protokolü.

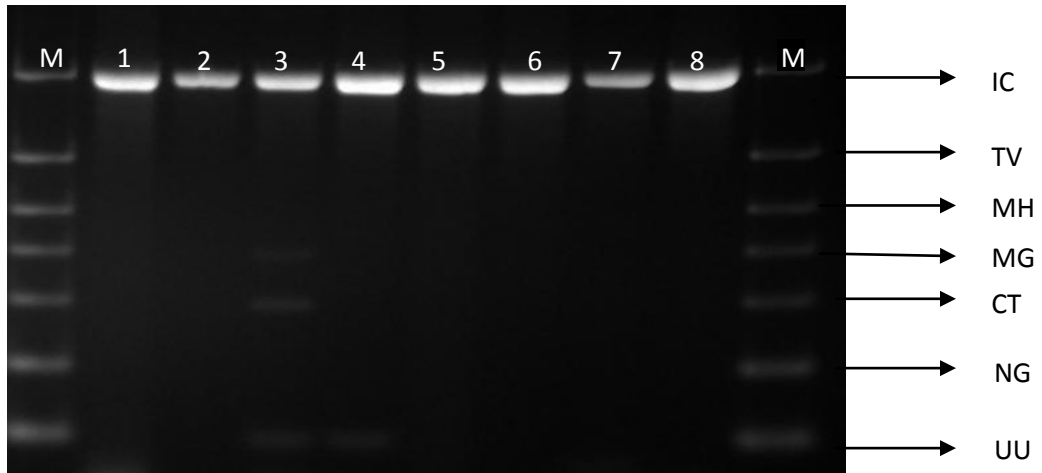
Segment	Siklus sayısı	Isı	Süre
1	1	94 ⁰ C	15dk
2	40	94 ⁰ C	0.5dk
		63 ⁰ C	1.5dk
		72 ⁰ C	1.5dk
3	1	72 ⁰ C	10dk

3.2.6. Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi

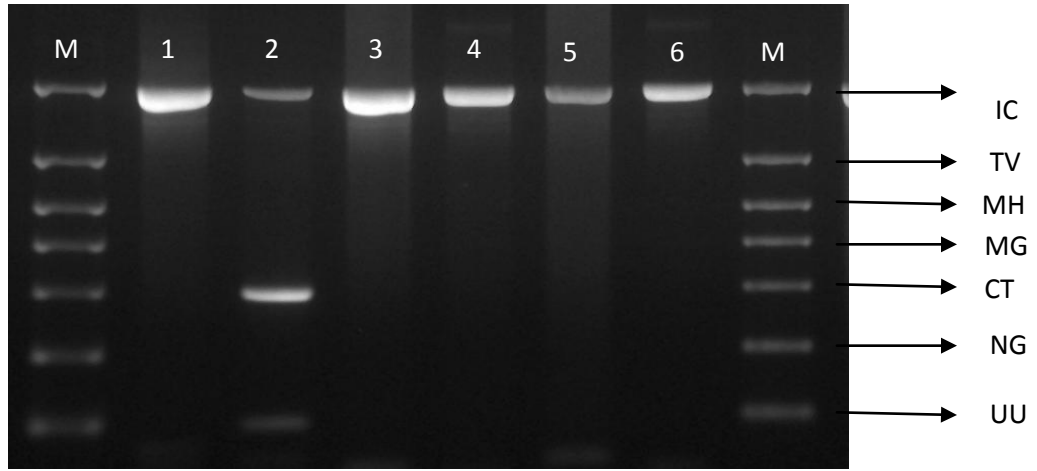
Amplifikasyon ürünü brom fenol mavisi içinde 3/4 oranında seyreltilip bu karışımın 5µl'si, içinde etidyum bromür bulunan %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. UV transluminatör altında DNA moleküler ağırlık standardı (QX 174/ *Hae* III), kontroller (pozitif ve negatif) ve STD ACE marker yardımıyla, oluşan bantlar değerlendirildi. Şekil 2'de amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü izlenmektedir. Tablo 3'te ise çalışmamızda kullanılan multipleks PZR kiti ile saptanabilen ajanların agaroz jeldeki büyüklükleri gösterilmiştir.



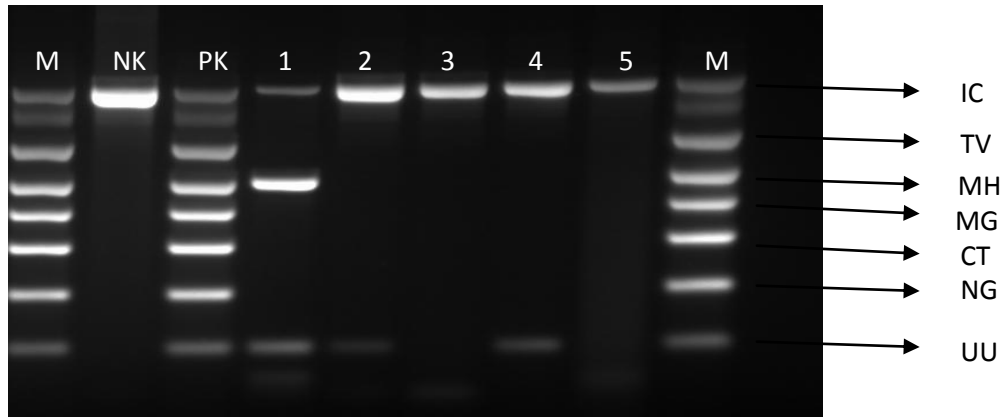
Şekil 2. Jel elektroforez görüntüsü. 1 nolu örnekte *M. hominis* pozitif iken 7 nolu örnekte *C. trachomatis* ve *U.urealyticum* pozitif olarak izlenmektedir. (M: Markır, IC: İnternal kontrol, TV: *Trichomonas vaginalis*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, CT: *C. trachomatis*, NG: *N. gonorrhoeae*, UU: *U. urealyticum*)



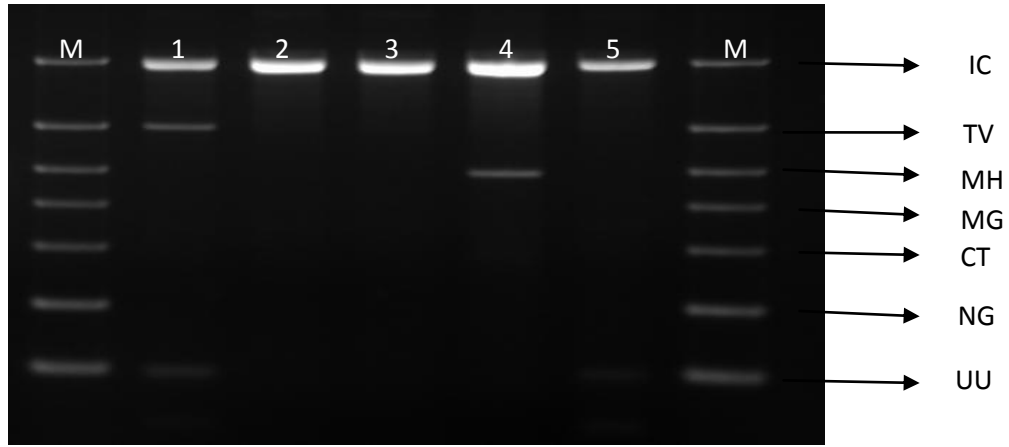
Şekil 3. Jel elektroforez görüntüsü. 3 nolu örnekte *M. genitalium*, *C. trachomatis* ve *U.urealyticum* pozitif iken 4 nolu örnekte tek başına *U.urealyticum* pozitif olarak izlenmektedir. (M: Markır, IC: İnternal kontrol, TV: *Trichomonas vaginalis*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, CT: *C. trachomatis*, NG: *N. gonorrhoeae*, UU: *U. urealyticum*)



Şekil 4. Jel elektroforez görüntüsü. 2 nolu örnekte *C. trachomatis* ve *U.urealyticum* pozitif olarak izlenmektedir. (M: Markır, IC: İnternal kontrol, TV: *Trichomonas vaginalis*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, CT: *C. trachomatis*, NG: *N. gonorrhoeae*, UU: *U. urealyticum*)



Şekil 5. Jel elektroforez görüntüsü. 1 nolu örnekte *M. hominis* ve *U.urealyticum* pozitif iken 2 ve 4 nolu örnekte *U.urealyticum* pozitif olarak izlenmektedir. (M: Markır, IC: İnternal kontrol, TV: *Trichomonas vaginalis*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, CT: *C. trachomatis*, NG: *N. gonorrhoeae*, UU: *U. urealyticum*, NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol)



Şekil 6. Jel elektroforez görüntüsü. 1 nolu örnekte *Trichomonas vaginalis* ve *U.urealyticum* pozitif iken 4 nolu örnekte *M. hominis*, 5 nolu örnekte ise *U.urealyticum* pozitif olarak izlenmektedir. (M: Markır, IC: İnternal kontrol, TV: *Trichomonas vaginalis*, MH: *M. hominis*, MG: *M. genitalium*, CT: *C. trachomatis*, NG: *N. gonorrhoeae*, UU: *U. urealyticum*)

Tablo 3. Çalışmamızda kullanılan multipleks PZR kiti ile saptanabilen ajanların agaroz jeldeki büyüklükleri.

Hedef	PZR ürününün büyüklüğü (bp)
İnternal kontrol	981
<i>Mycoplasma hominis</i>	502
<i>Mycoplasma genitalium</i>	410
<i>Chlamydia trachomatis</i>	314
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	214

3.2.7. Sonuçların yorumlanması

Agaroz jeldeki bant görüntüleri tablo 4'e göre yorumlanmış olup tabloda da belirtildiği gibi IC ve hedef mikroorganizmaya ait bantı birlikte gözlendiğinde hedef patojenin varlığı kabul edildi.

Tablo 4. Agaroz jel sonuç değerlendirme protokolü.

	IC	Hedef	Yorumlama
Durum 1	+	+	Hedef patojen saptanmıştır. Örnek (+)
Durum 2	+	-	Patojen saptanamamıştır. -yeterli örnek toplanabilmiş mi? -yeterli nükleik asit miktarı? -inhibitörlerin yokluğu?
Durum 3	-	+	Hedef patojen saptanmıştır. Bu test yeniden çalışılarak konfirme edilmeli.
Durum 4	-	-	Örnekte inhibitör madde var, tekrarla.

3.2.8. Tüberküloz ‘‘In-House’’ PZR Yöntemi

Çalışmamızda Eisenach ve arkadaşlarının *M. tuberculosis* kompleksi genomunda bulunan 1355 bp uzunluğundaki IS6110 gen bölgesindeki 123 bp'lik kısmı amplifiye eden T₄ 3'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-5' ve T₅ 3'-CTC GTC CAG GGC CGC TTC GG-5' primerleri kullanıldı (192).

2X amplifikasyon karışımının hazırlanışı:

1. 10X amplifikasyon tampon (enzime özgül) 200 µl

2. 10X dNTP miks (2,5 mM her bir nükleotid)	200 µl
3. 10X MgCl ₂ (10 mM)	200 µl
4. 10X BSA (1 mg/ml)	200 µl
5. Distile su	200 µl

Toplam 50µl olan amplifikasyon tüpünün içeriği:

- 5 µl ekstraksiyon ürünü
- 25 µl 2X amplifikasyon karışımı
- 0.5 µl T₄ (20 pmol/ µl), 0,5 µl T₅ (20 pmol/ µl)
- 0.3 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)
- 18.7 µl distile su

Hazırlanan karışım tablo 5'te gösterilen protokol baz alınarak termal döngü cihazında amplifiye edildi.

Tablo 5. Termal döngü cihazında kullanılacak amplifikasyon protokolü.

Segment	Siklus sayısı	ISI	SÜRE
1	1	94 ⁰ C	4 dk
		94 ⁰ C	2 dk
2	35	56 ⁰ C	3 dk
		72 ⁰ C	2 dk

3.2.8.1. Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi

Amplifikasyon ürünü brom fenol mavisi içinde 3/4 oranında seyreltildi. Bu karışımın 10 µl'si, içinde etidyum bromür bulunan %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. UV transluminatör altında DNA moleküler ağırlık standardı (QX 174/ *Hae* III) ve kontroller (pozitif ve negatif) yardımıyla oluşan bantların değerlendirilmesi yapıldı.

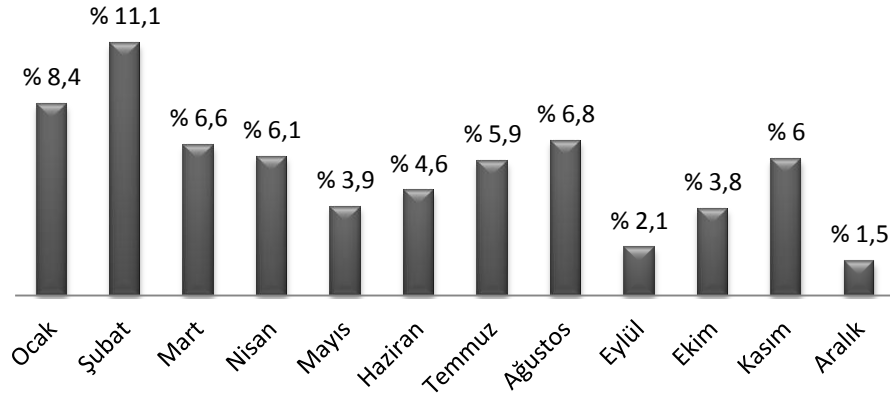
3.2.9. Sonuçların değerlendirilmesi

Veriler, ‘‘SPSS 20.0 for Windows’’ (SPSS inc-A.B.D.) istatistik program ile analiz edilmiştir. Kategorik verilerin özetlenmesi için sayı ve yüzde kullanılmıştır. Nitel veri karşılaştırmalarında süreklilik, düzeltmeli kıkare (χ^2) ve Fischer’in kesin χ^2 testi kullanılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tez çalışmamız dahilinde; Ocak 2012 ile Aralık 2012 tarihleri arasında bir yıl süresince, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Merkez Laboratuvarı'na Üroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları kliniklerinden üriner sistem enfeksiyonu şüphesi ile gönderilmiş 18 ile 70 yaş arası (ortalama yaş 48) hastaların idrarları incelenmiştir. Örneklerde günlük olarak thoma lamında lökosit sayımı yapılmıştır. Milimetre küpte 10 ve üzeri lökosit tespit edilen ve rutin mikrobiyolojik yöntemlerle üreme saptanamayan idrar örnekleri steril piyüri olarak kabul edilip çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu idrar örneklerinde moleküler mikrobiyolojik yöntemlerden biri olan multipleks PZR yöntemi kullanılarak *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* ve *N. gonorrhoeae*, "in house" PZR yöntemi ile de *M. tuberculosis* varlığı araştırılmıştır.

Tüm yıl süresince 6629 idrar örneği değerlendirildi ve 487 (%6.26) tanesinde steril piyüri saptandı. Steril piyüri saptanma oranlarının aylara göre dağılımı şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Aylara göre steril piyüri oranları.

Aynı hastalara ait örnekler çıkarıldığında, toplamda 351 steril piyürlü hasta numunesi çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin 134 (%38.2)' ü kadın hastalara, 217 (%61.8)'si ise erkek hastalara aittir.

Toplam 351 steril piyürlü hasta örneğinin 125 (%35.6)' inde bir veya birden fazla mikrobiyolojik etken saptanmıştır. Pozitif bulunan örneklerin 56'sı (%41.8) kadın, 69'u (%31.8) ise erkek hastalara aittir.

Pozitif olan 56 kadın hasta örneğinin 46 (%82,1)'sında tek etken (32 *U. urealyticum*, 12 *M. hominis*, 1 *M. genitalium*, 1 *N. gonorrhoeae*), 9 (%16,1)'unda iki etken (4 *U. urealyticum* ve *M. hominis*, 2 *U. urealyticum* ve *C. trachomatis*, 1 *M. hominis* ve *N. gonorrhoeae*, 1 *M. genitalium* ve *C. trachomatis*, 1 *U. urealyticum* ve *N. gonorrhoeae*) ve 1 (%1,8)'inde ise üç etken (*U. urealyticum*, *M. genitalium* ve *C. trachomatis*) saptanmıştır.

Pozitif olan 69 erkek hasta örneğinin ise 58 (%84,1)'inde tek etken (47 *U. urealyticum*, 6 *M. hominis*, 3 *M. genitalium*, 1 *N. gonorrhoeae*, 1 *C. trachomatis*), 9 (%13)'unda iki etken (6 *U. urealyticum* ve *M. hominis*, 1 *U. urealyticum* ve *C. trachomatis*, 1 *U. urealyticum* ve *M. genitalium*, 1 *N. gonorrhoeae* ve *C. trachomatis*), 2 (%2,9)'sinde üç etken (ikisinde de *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae* ve *C. trachomatis*) saptanmıştır.

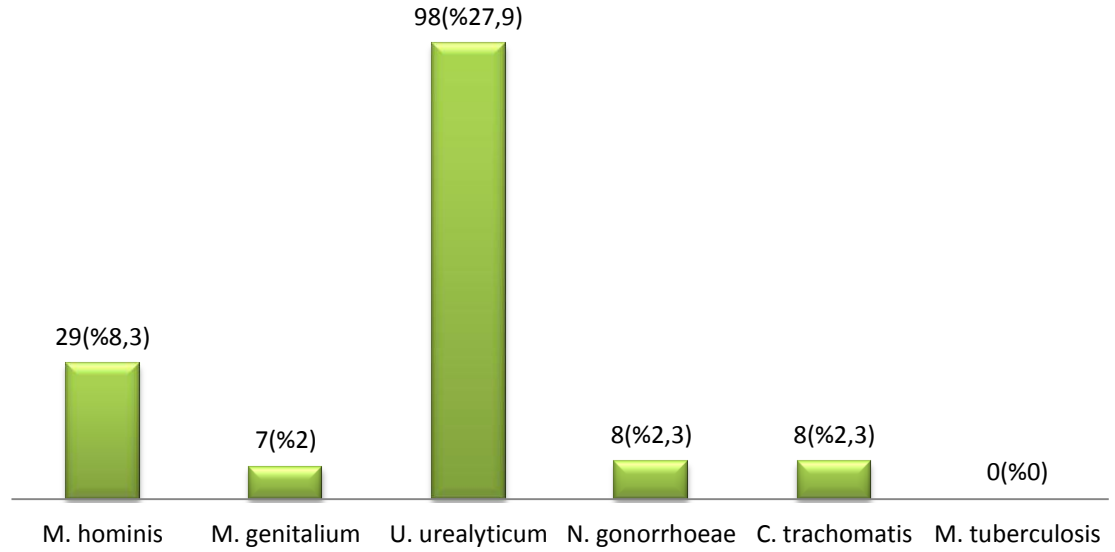
Aylara ve cinsiyete göre steril piyürlü örneklerin sayı ve yüzde olarak dağılımı yapılmıştır. Bu dağılım içinde bir veya birden fazla etkenin pozitif saptanma oranlarının

yanı sıra; tek etken, iki etken ve üç etken tespit edilen örnek sayı ve oranları tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Sonuçların aylara ve cinsiyete göre dağılımı.

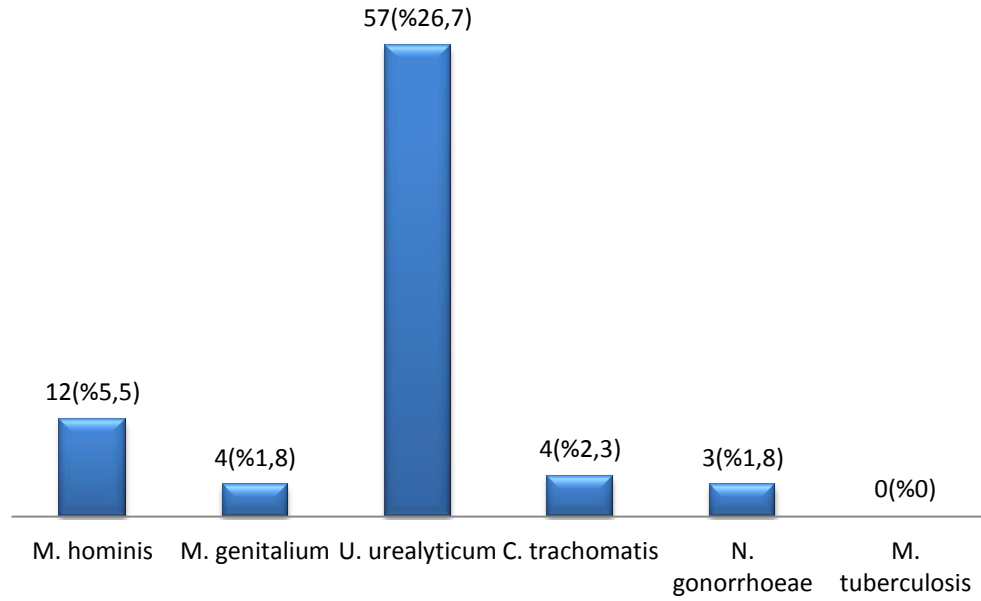
Aylar	Cinsiyet	Steril piyürili		Tek etken(+)	İki etken(+)	Üç etken(+)
		örnek sayısı-yüzdesi	$1 \leq$ etken pozitif			
Ocak	Kadın	8 (%21)	2 (%25)	2 (%100)	-	-
	Erkek	30 (%79)	4 (%13,3)	3 (%75)	1 (%25)	-
Şubat	Kadın	17 (%32,7)	4 (%23,5)	4 (%100)	-	-
	Erkek	35 (%67,3)	4 (%11,4)	3 (%75)	1 (%25)	-
Mart	Kadın	12 (%36,3)	3 (%25)	1 (%33,3)	1 (%33,3)	1 (%33,3)
	Erkek	21 (%63,7)	3 (%14,3)	2 (%66,6)	1 (%33,3)	-
Nisan	Kadın	19 (%57,5)	5 (%26,3)	3 (%60)	2 (%40)	-
	Erkek	14 (%42,5)	4 (%28,5)	3 (%75)	1 (%25)	-
Mayıs	Kadın	12 (%50)	9 (%75)	7 (%77,7)	2 (%22,3)	-
	Erkek	12 (%50)	8 (%66,6)	7 (%87,5)	1 (%12,5)	-
Haziran	Kadın	10 (%38,5)	6 (%60)	5 (%83,3)	1 (%16,7)	-
	Erkek	16 (%61,5)	8 (%50)	7 (%87,5)	-	1 (%12,5)
Temmuz	Kadın	13 (%39,4)	5 (%38,5)	4 (%80)	1 (%20)	-
	Erkek	20 (%60,6)	7 (%35)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	-
Ağustos	Kadın	18 (%44)	6 (%33,3)	6 (%100)	-	-
	Erkek	23 (%56)	10 (%43,4)	9 (%90)	-	1 (%100)
Eylül	Kadın	6 (%50)	2 (%33,3)	2 (%100)	-	-
	Erkek	6 (%50)	-	-	-	-
Ekim	Kadın	4 (%25)	2 (%50)	2 (%100)	-	-
	Erkek	12 (%75)	7 (58,3)	5 (%71,4)	2 (%28,6)	-
Kasım	Kadın	11 (%33,3)	9 (%81,8)	8 (%88,8)	1 (%11,2)	-
	Erkek	22 (%66,6)	11 (%50)	10 (%90,9)	1 (%9,1)	-
Aralık	Kadın	4 (%40)	3 (%75)	2 (%66,6)	1 (%33,3)	-
	Erkek	6 (%60)	3 (%50)	3 (%100)	-	-

U. urealyticum kadınlarda %30,6 (41), erkeklerde %26,7 (57) oranında olmak üzere toplamda %27,9 (98); *M. hominis*; kadınlarda %12,7 (17), erkeklerde %5,5 (12) olmak üzere toplamda %8,3 (29); *M. genitalium* kadınlarda %2,2 (3), erkeklerde %1,8 (4) oranında olup toplamda %2 (7); *C. trachomatis* kadınlarda %2,2 (3), erkeklerde %2,3 (5) olmak üzere toplamda %2,3 (8); *N. gonorrhoeae* ise kadınlarda %3 (4), erkeklerde %1,8 (4) olmak üzere toplamda %2,3 (8) oranında pozitif saptanmıştır. Toplam pozitiflik oranları Şekil 8’de gösterilmiştir.

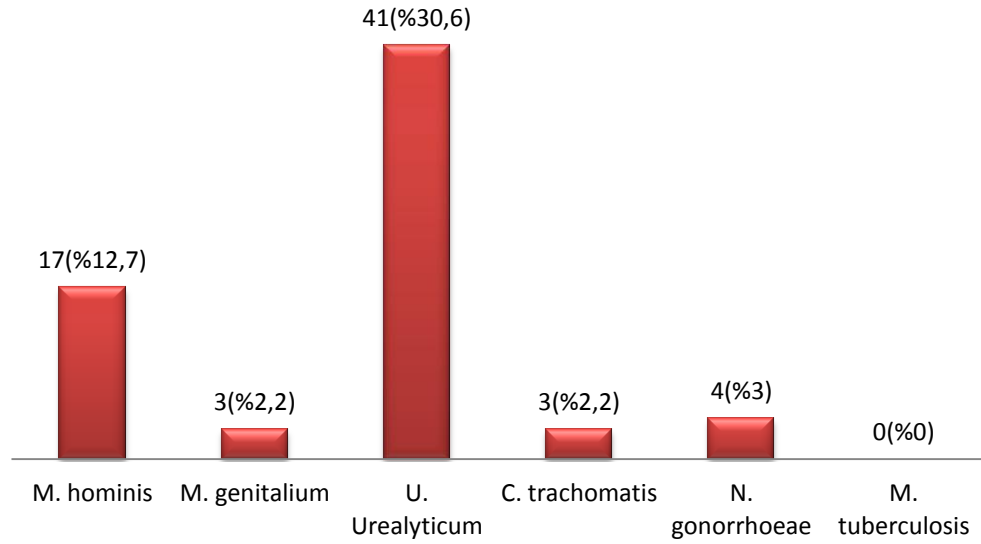


Şekil 8. Tespit edilen mikroorganizmaların saptanma oranları.

Tespit edilen mikroorganizmalar açısından cinsiyetler arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiş olup tüm verilere χ^2 ve Fischer’in kesin χ^2 testi uygulanmıştır. Çalışmamızda *M. hominis* kadın cinsiyette anlamlı derecede yüksek ($p=0,030$) bulunmuş olup; *M. genitalium* ($p<1,0$), *U. urealyticum* ($p=0,330$), *N.gonorrhoeae* ($p=0,487$) ve *C. trachomatis* ($p<1,0$) açısından anlamlı farklılık saptanamamıştır. Erkek popülasyondaki yıllık mikroorganizma pozitiflik oranları şekil 9’da, kadın popülasyondaki yıllık mikroorganizma pozitiflik oranları ise şekil 10’da gösterilmiştir.



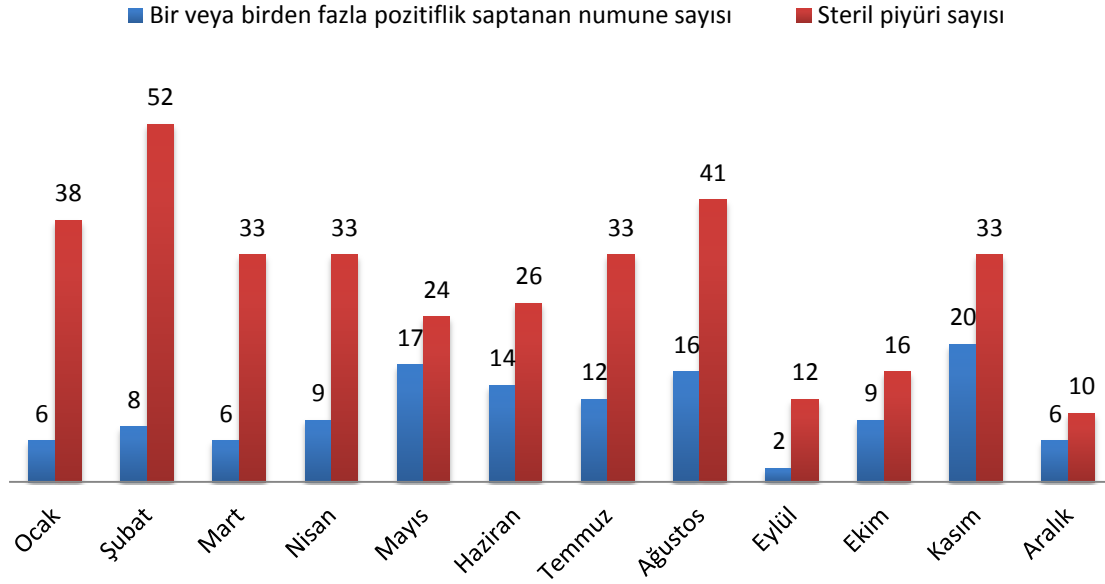
Şekil 9. Erkek popülasyonda tespit edilen etkenler.



Şekil 10. Kadın popülasyonda tespit edilen etkenler.

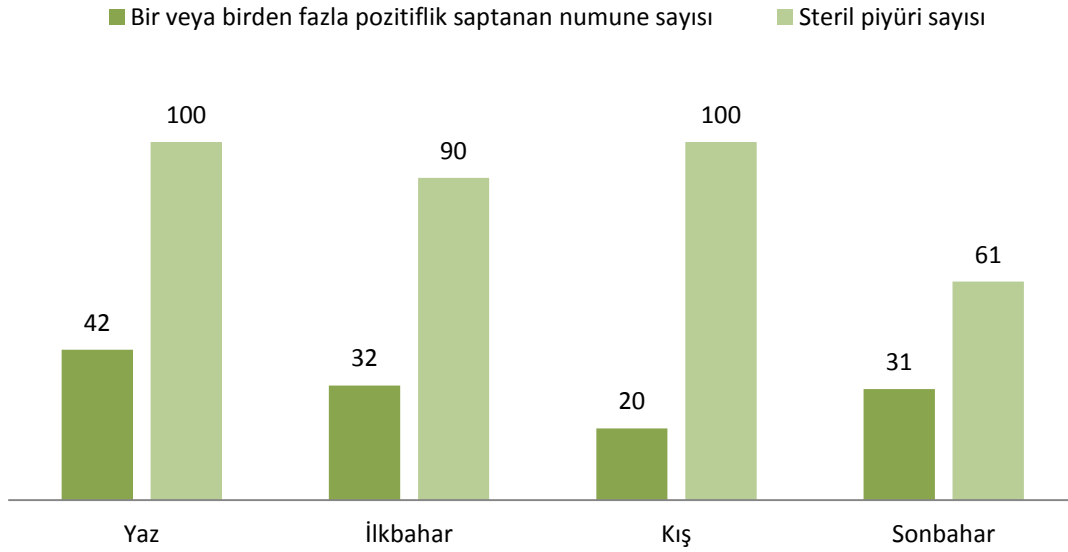
Mevcut mikroorganizmaların aylara göre pozitiflik oranları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde *U. urealyticum*; şubat, mayıs, haziran, ekim ve kasım aylarında anlamlı derecede yüksek ($p < 0,001$) bulunmuş olup *M. hominis* ($p = 0,418$), *M. genitalium*

($p = 0.848$), *N. gonorrhoeae* ($p = 0.137$) ve *C. trachomatis* ($p = 0.666$) açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır. Değerlendirmeler sonucunda elde ettiğimiz bulguların aylara göre dağılımı ise şekil 11’de gösterilmiş olup şu şekilde saptanmıştır.



Şekil 11. Aylara göre pozitiflik saptanma dağılımı

Bir veya birden fazla mikrobiyolojik etkenin pozitif saptanma oranlarının mevsimlere göre dağılımı incelenmiştir. Kış mevsiminde 100 numunede steril piyüri saptanmış, bunların 20 (%20)’sinde bir veya birden fazla etken tespit edilmiştir. Diğer mevsimlere bakıldığında; sonbahar’da steril piyüri saptanan 61 numunenin 31’inde (%50.8), yaz mevsiminde 100 numunenin 42’sinde (%42), ilkbaharda ise 90 numunenin 32’sinde (%35.5) bir veya birden fazla etken pozitifliği saptanmıştır. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, *U. urealyticum* kış mevsiminde anlamlı oranda düşük ($p < 0.001$) saptanmıştır. *M. hominis* ($p = 0.765$), *M. genitalium* ($p = 0.787$), *N. gonorrhoeae* ($p = 0.612$) ve *C. trachomatis* ($p = 0.696$) açısından ise mevsimsel açıdan farklılık saptanamamıştır. Mevsimlere göre tespit edilen mikroorganizmaların dağılımı şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Mevsimlere göre mevcut mikroorganizmaların dağılımı

İstatistiksel açıdan homojen gruplar oluşması amaçlanarak çalışmaya dahil edilen hastalar 45 yaştan küçük ve büyük olmak üzere iki gruba ayrıldığında; *M. hominis* ($p=0,001$) ve *M. genitalium* ($p = 0,048$) 45 yaş altı grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. *U. urealyticum* ($p = 0,883$), *N. gonorrhoeae* ($p = 0.146$), *C. trachomatis* ($p = 0.475$) açısından ise iki yaş grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Steril piyürlü hastalara ait 351 idrar örneğinde "in house" PZR yöntemi ile *M. tuberculosis* taranmış olup hiçbir örnekte pozitiflik saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Üriner sistem infeksiyonu ile uyumlu klinik semptomlarla birlikte steril piyürinin varlığı, rutin mikrobiyolojik testler sırasında atlanabilen, önemli bir tanısal sorundur. Bu durumdan yola çıkarak, çalışmamızda steril piyürlü hastaların idrarında PZR yöntemi ile *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* ve *M. tuberculosis* etkenlerini saptamayı amaçladık.

Mycoplasma hominis, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* ve *M. tuberculosis* gibi zor üreyen ve/veya atipik mikroorganizmalar steril piyüriye neden olmaktadır (193). Rutin mikrobiyolojik testlerle saptanması zor olan söz konusu mikroorganizmalar üriner sistemin pek çok hastalığı ile ilişkilidir. Ancak bu etkenlerin tanısında rutin kültür işlemleri yetersiz kalmaktadır (194, 195).

Rutinde mikrobiyolojik uygulamalarda idrar numunelerinin ekimi, biri genel üretim besiyeri diğeri seçici besiyeri olmakla üzere iki besiyerine yapılmaktadır. Mikoplazma ve Üreaplazmaların özel üretim besiyerlerinde, neisseria gibi nazlı bakterilerin çukulatamsı besiyerinde daha iyi üremesi, kültürün bu mikroorganizmalar açısından duyarlılığını azaltmaktadır. Klamidyalar ise rutin kültür işleminde üretilmeyen mikroorganizmalardır. Bu nedenle bu mikroorganizmaların tanısında kültür dışı yöntemlere de başvurulması gerekebilmektedir. Bu tip mikroorganizmaların tanısında sıklıkla başvurulmuş kültür dışı tanı yöntemi nükleik asit amplifikasyon testleridir.

Günümüzde nükleik asit amplifikasyon testlerinin, optimum duyarlılığı yakalamış olmaları, non-invaziv ve örnek taşınması esnasında oluşabilecek problemlerden fazla etkilenmemeleri rutinde kullanılmaları için önemli sebeplerdir. Bu testlerden multipleks

PZR'nin en önemli avantajı aynı örnekte farklı mikroorganizmalara ait hedef dizilerinin eş zamanlı olarak tespitine imkan vermesidir (196-198).

Çalışmamızda; 2013 yılı süresince anabilim dalımız laboratuvarına gönderilen ve üriner sistem infeksiyonuna ilişkin şikâyetleri bulunan 18-70 yaş arası hastalara ait 6629 idrar örneği değerlendirildi. Bunlardan 487 tanesinde steril piyüri (%6,26) saptandı. Tekrarlayan hastalara ait örnekler çalışma kapsamından çıkarıldı. Kalan 351 hastanın, kültür için gönderilen orta akım idrarında söz konusu mikroorganizmaların varlığı araştırıldı. Literatürde ilk akım ya da orta akım idrar kullanılan farklı çalışmalar mevcuttur. Örneğin; Latthe ve ark.'ları da çalışmalarında üriner sistem şikayetleri olan steril piyüri/piyürisiz kadınların orta akım idrarında *U. urealyticum* ve *M. hominis* varlığını orta akım idrarında araştırmışlardır (199).

Steril piyüri hastaların idrarında *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* ve *M. hominis*'i tespit etmek için Seeplex(®) STD6 ACE (Seegene, Kore) kitini kullandık. Lee ve ark.'larının bu kit kullanılarak yaptıkları çalışmada, toplamda 739 örnek test edilmiş ve elde edilen sonuçlar monopleks PZR ile karşılaştırılmıştır. Multipleks PZR ile monopleks PZR arasında % 100 sensitivite ve spesifite ile uyum saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda bu kitlerin; söz konusu patojenlerin hızlı tanısına imkan veren, yüksek spesifite ve sensitiviteli, düşük maliyetli oldukları kanısına varılmıştır (200).

Çalışmamızda 351 orta akım idrar örneğinin 125'inde (%35.6) araştırma kapsamında olan bir veya birden fazla etken saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, steril piyüri hastalarda etken tespit oranı, kullanılan yöntemlere, araştırılan mikroorganizmalara ve seçilen hasta grubuna göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin; , Nassar ve ark.'ları *C. trachomatis*, *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum*'u araştırdıkları çalışmada steril piyüri hastalarda %19 oranında etken tespit etmişlerdir. Daxboeck ve ark.'ları ise *M. hominis* ve *U. urealyticum* araştırdıkları çalışmada %23.3 oranında etken saptamışlardır. Latthe ve ark.'ları sadece *U. urealyticum* ve *M. hominis* varlığını araştırdıkları çalışmalarında, örneklerin %33.7'sinde etken saptamışlardır. Ülkemizden yapılan bir diğer çalışmada ise *M. hominis* ve *U. urealyticum* varlığı araştırılmış %32.5 oranında etken tespit edilmiştir (5, 199, 201, 202). Bizim oranlarımız literatür ile uyum göstermektedir.

Genital mikoplazmalar, puberte sonrası ve genç erişkinlik döneminden itibaren ürogenital sistem mukozalarında kolonize olmaktadır. Bu mikroorganizmaların enfeksiyonla ilişkilerini araştırmaya yönelik pek çok çalışma mevcuttur. *Ureaplasma* spp'nin erkeklerde nonklamidyal, nongonokokkal üretrit (NCNGU) etkeni olabileceğinin serolojik ve terapötik çalışmalarla desteklemesiyle birlikte (203), *M. hominis*'in nongonokokkal üretrit (NGU)'e neden olduğuna yönelik bir kanıt bulunamamıştır (204). Bununla birlikte mikoplazmaların kronik prostatitli hastaların prostat sıvılarından, nonklamidyal nongonokokkal akut epididim-orşitli hastaların epididim aspiratlarından izole edilmeleri (205, 206) ve her iki mikroorganizmanın da endometrit, korioamniyonit, membranların prematüre rüptürü, düşük doğum ağırlıklı bebek gibi durumlara neden olabilmesi (19) klinik açıdan önem arz etmektedir.

Yüce ve ark.'larının in vitro koşullarda yaptığı çalışmada, steril idrara *U. urealyticum* inokulasyonu yapıp oluşabilecek değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Sağlıklı 10 insan idrarının bir araya toplanıp filtre edilerek steril idrar örneği hazırlanıp bir hastadan izole edilmiş 12-18 saatlik *U. urealyticum* kültürü idrar örneğine inoküle edilmiştir. 16-24 saat sonra idrarın pH'sının arttığı ve dipte bir çökelti oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan çökeltinin biyokimyasal analizi sonucunda postenfeksiyöz taşlarda da bulunabilen fosfat ve magnezyum saptanmıştır. Bu sonuçlardan *U. urealyticum*'un postenfeksiyöz taş oluşumundan sorumlu olabileceği ve tekrarlayan enfeksiyon vakalarında bu mikroorganizmanın etken olabileceği düşünülerek rutin idrar kültürünün yanısıra *U. urealyticum* için spesifik tekniklerin uygulanması gerektiği kanısına varılmıştır (33).

Yaptığımız çalışmada steril piyürili idrar örneklerinin %27,9'unda *U. urealyticum*, %8,3'ünde *M. hominis* ve %2'sinde ise *M. genitalium* pozitifliği saptandı. Çalışılan mikroorganizma türleri ve konu açısından çalışmamıza en yakın çalışma Nassar ve ark.'ları tarafından Gazze'de yapılmış olup steril piyürili 200 ilk akım idrarda *C. trachomatis*, *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* varlığı araştırılmıştır. Monopleks PZR yönteminin kullanıldığı çalışmada *C. trachomatis* %10, *U. urealyticum* %5, *M. hominis* %3 ve *M. genitalium* %1 oranında pozitif saptanmıştır. Yine Daxboeck ve ark.'larının steril piyürili 30 hasta üzerinde yaptığı bir çalışmada; *M. hominis* ve *U. urealyticum* varlığı PZR

yöntemi ile araştırılmıştır. Örneklerin %20'sinde *U. urealyticum*, %7'sinde *M. hominis* saptanmıştır (5, 201)

Her iki çalışmada da *U. urealyticum*, *M. hominis* ve *M. genitalium* oranları bizim çalışmamıza göre daha düşük bulunmuştur. Bu çalışmalarda tespit edilen mikroorganizmaların steril piyüri ile ilişkili olduğunu öne süren araştırmacılar; PZR'nun steril piyüri vakalarında zor üreyen mikroorganizmaların saptanmasında hızlı ve efektif bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca bu etkenlerin PZR ile hızla tespit edilmesinin, tedavinin yönlendirilmesi açısından çok faydalı olacağı kanısına varılmıştır. Buna ek olarak prevalansların karşılaştırılması açısından steril piyüri olmaksızın asemptomatik vakalara yönelik çalışmaların yapılması gerekliliğine dikkat çekilmiştir (201)

Sarsar'ın yaptığı tez çalışmasında ise steril piyüri tespit ettikleri 60 kadın hasta ile sağlıklı 40 kadının idrar örneklerinde *U. urealyticum* ve *M. hominis* araştırılmıştır. Steril piyüri grubunda *U. urealyticum* %50, *M. hominis* %6.6 oranında pozitifken sağlıklı grupta *U. urealyticum* %32.5, *M. hominis* ise %5 oranında pozitif saptanmıştır. Bu çalışmada, *U. urealyticum* sonuçları bizim çalışmamıza nazaran yüksek olmasına rağmen *M. hominis* bizim çalışmamızdan daha düşük oranda saptanmıştır. Yaptıkları istatistiksel analizler sonucu her iki mikroorganizma açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı ilişki saptanamamış olup hasta grubu içerisinde, farklı yaş grupları arasında yapılan karşılaştırmada da (her birinde $p=0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (207).

Ülkemizden yapılan bir çalışmada Kılıç ve ark.'ları, steril piyüri saptanan; 244 erkek ve 256 kadın olmak üzere toplamda 500 hastada *U. urealyticum* varlığını araştırmışlardır. Bu çalışmada, hastalardan idrar ve sperm örneği alınmıştır. Erkek hastalarda %61.85, kadınlarda %74.98 olmak üzere örneklerin %68.6'sında *U. urealyticum* izole edilmekle birlikte bu oranlar bizim çalışma sonuçlarımızdan yüksektir. Örneklerle göre pozitiflik oranları ise sperm örneklerinde %69, idrar örneklerinde ise %63.2 olduğunu belirtip ürogenital sistem enfeksiyonu olanlarda yüksek oranda *U. urealyticum* varlığına dikkat çekmişlerdir (208). Afacan ve ark.'ları tarafından, steril piyüri saptanan 461 (384 kadın, 77 erkek) hastaya ait idrar örneğinde *M. hominis* ve *U. urealyticum* sıklığı

araştırılmıştır. *Mycoplasma hominis* %9,8 ve *U. urealyticum* %29,7 oranında pozitif saptanmakla sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (202).

Latthe ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, steril piyüri/piyürisiz üriner sistem şikayetleri olan kadınlarda *U. urealyticum* ve *M. hominis* varlığı araştırılmışlardır. Bu çalışmada bir yıl süresince 1032 orta akım idrar örneğini kültür yöntemi ile değerlendirilmiştir. Toplam pozitif kültür oranı %33.7 (97/288) iken, *U. urealyticum* prevalansı %26 ve her ikisinin birden pozitif saptanma oranı %7.6 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte toplam pozitiflik oranı, *U. urealyticum* ve *M. hominis* pozitiflik oranları bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (199).

Genital mikoplazmalara dair prevalans çalışmaları yalnızca steril piyüri örneklerde çalışılmamakla birlikte prevalans çalışmaları ile infeksiyon durumunu ilişkilendirilmeye çalışan yurt içi ve yurt dışı pek çok çalışma mevcuttur.

Schlicht ve ark.'larının üretral/servikal akıntı, pelvik ağrı, testiküler ağrı ve dizüri gibi ürogenital infeksiyonu işaret eden şikayetleri olan 65 semptomatik ve 137 asemptomatik kolej öğrencisinden alınan idrar, üretral ve servikal sürüntü örneklerinde PZR ile genital mikoplazmalar araştırılmıştır. Semptomatik erkeklerin %62'sinde *Ureaplasma spp.*, %12'sinde *M. hominis* pozitif olmakla birlikte semptomatik kadınların %54'ünde *Ureaplasma spp.*, %26'sında *M. hominis* pozitifliği saptanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen *M. hominis* ve *U. urealyticum* sonuçları bizim çalışmamıza nazaran yüksek olmakla birlikte anormal ürogenital bulgularla *Ureaplasma*lar arasında güçlü bir ilişki ortaya konmuştur (209).

Dabke ve ark.'ları üretrit şikayeti olan 228 erkek hastadan kültür yapmak için üretral akıntı ve idrar örnekleri toplayıp NGU'lu hastalarda *U. urealyticum* sıklığını araştırmışlardır. Non gonokoksik üretritli hastaların %47.5'inde *U. urealyticum*, %3.5'inde *M. hominis* izole etmişlerdir. Kontrol grubunda ise %17.5 oranında *U. urealyticum* izole edilmiş ve *U. urealyticum* ile üretrit şikayeti olan hastalar arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir. *U. urealyticum* saptama oranı bizim çalışmamızdan yüksek olmasına rağmen *M. hominis* daha düşük bulunmuştur (210).

Çalışmamızda, *M. hominis* kadın cinsiyette anlamlı derecede yüksek ($p= 0,030$) bulunmuş olup diğer mikroorganizmalar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

bulunamamıştır. Daxboeck ve ark.'ları da bizim çalışmamızla uyumlu olarak *M. hominis*'i kadın cinsiyette istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek ($p=0,007$) saptamışlardır. Ancak mevcut bulguların ürogenital mikoplazma infeksiyonu/kolonizasyonu ile steril piyüri arasında bir ilişki olduğu anlamına gelmeyeceğini öne sürmüşlerdir (5). Nassar ve ark.'ları ise yaptıkları çalışmada *M. hominis*'in yanında *U. urealyticum*'u da (her ikisi de $p = 0,008$) kadın cinsiyette istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulmuşlardır (201). Bununla birlikte Sarsar ve ark.'ları ise her iki cinsiyet arasında *M. hominis* ve *U.urealyticum* açısından anlamlı farklılık bulamamışlardır ($p = 0.05$) (207).

Çalışmamızda, yaşlara göre etkenlerin dağılımı incelendiğinde 45 yaş altı grupta *M. hominis* ($p = 0.001$) ve *M. genitalium* ($p = 0,048$) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yaşa göre etkenlerin görülme sıklığını tartışabileceğimiz çok az sayıda literatür bulunmaktadır. Sarsar ve ark.'ları, *M. hominis* ve *U. urealyticum*'u araştırdıkları çalışmada yaş grupları arasında fark bulamamışlardır (207).

Ureaplasma urealyticum ($p=0.001$) kış mevsiminde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş olup diğer mikroorganizmalar açısından farklılık bulunamamıştır. Aylara göre pozitif saptanma oranları karşılaştırıldığında ise *U.urealyticum*; şubat, mayıs, haziran, ekim ve kasım aylarında (her birinde $p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. Yine steril piyüri hastalarda, etkenlerin mevsimlere göre dağılımının değerlendirilebileceği yeterli veri yoktur.

Chlamydia trachomatis ve *Neisseria gonorrhoeae*, cinsel yolla bulaşan hastalıkların en önemli etkenlerinden olup sıklıkla belirtisiz seyretmektedirler. Bu etkenler, tanıdaki yetersizlikler ve tedavi alan hastalarda görülebilen reaktivasyonlar nedeniyle hala önemli bir halk sağlığı problemi olma özelliklerini sürdürmektedirler. Bu nedenlerle söz konusu etkenleri için, muhtemel komplikasyonların gelişmesinin önüne geçmek adına ampirik tedavi öne çıkmaktadır.

Ülkemizde *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* infeksiyonları epidemiyolojisine ilişkin az sayıda çalışma mevcuttur. *Chlamydia trachomatis*'e bağlı üriner sistem infeksiyonlarının genellikle asemptomatik seyretmesi, tanı koyabilecek kapasitedeki laboratuvar sayısının az olması ve ülkemizde henüz 2004 yılında bildirimi zorunlu hastalıklar kapsamına alınması nedeniyle *C. trachomatis* prevalansı hakkında az sayıda

bilgi mevcuttur (211-213). Bu etken için bir diğer önemli sınırlama da, vajen sürüntüsü ve vajinal sıvı gibi örneklerin alımında yaşanabilecek zorluklardır. Ancak yapılan karşılatırmalı çalışmalar, idrar örneklerinin de, en az sürüntü örnekleri kadar duyarlı olduğunu göstermektedir (214-216). Bu çalışmalarda, idrar örneklerinde duyarlılığının %50 ile %90 arasında olduğu bildirilmektedir.

Çalışmamızda, kadınlarda %2.2, erkeklerde %2.3 olmak üzere toplamda %2.3 oranında *C. trachomatis* saptanmıştır. *Chlamydia trachomatis* prevalansına yönelik farklı çalışmalarda çok değişken sonuçlar elde edilmiş olup Çakal'ın (217) yaptığı çalışmada; *C. trachomatis*'in prevalansı, cinsel yolla bulaşan hastalıklar kliniğine başvuran kadın hastalarda %4-27, aile planlaması merkezlerine başvuran kadın hastalarda %6.2-18, asemptomatik kadın hastalarda %6.7-9.2, servikal akıntı şikayeti olan kadınlarda %0 ile %42 arasında bildirilmiştir (218). *C. trachomatis* prevalansı değişik çalışmalarda çok farklı bildirilse de sağlıklı bireylerde %0-26 arasında kabul edilmektedir (218, 219). Lindan ve ark.'larının (220) 2005 yılındaki çalışmalarında, erkek hastalardan alınan idrar örneklerinde PZR ile *C. trachomatis* prevalansı %2.2 olarak saptanmıştır. Cosentino ve ark.'larının (221) 2003 yılında yaptıkları çalışmada ise *C. trachomatis* prevalansı %3.1 olarak bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz *C. trachomatis* oranları Lindan ve ark.'ları ile Cosentino ve ark.'larının verileriyle benzerlik göstermektedir.

Toye ve ark.'larının 1996 yılındaki çalışmasında (222), *C. trachomatis* prevalansı kadınlarda %7.9, erkeklerde %7.6 olarak bulunmuştur. Goessens ve ark.'ları (110), 1997'de *C. trachomatis* prevalansını %7.7 olarak tespit etmişlerdir. Çiçek ve ark.'larının (223), semptomatik hastalarda yaptığı çalışmada *C. trachomatis* prevalansı %12.3 olarak tespit edilmiştir. Abaslı'nın 2007'de yaptığı tez çalışmasında ise Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde geriye dönük olarak 2 yıllık dönemde *C. trachomatis* pozitiflik oranı %8.4 olarak bulunmuştur (224). Toye ve ark.'ları, Goessens ve ark.'ları ile Çiçek ve ark.'larının elde ettiği oranlar birbiri ile benzer olmakla birlikte bizim bulduğumuz oranlardan yüksektirler.

Ortaylı ve ark.'larının (225), 569 hastayı kapsayan çalışmalarında ise *C. trachomatis* prevalansı %1.9 olarak bulunmakla birlikte çalışmamızda daha yüksek yüzdede pozitiflik saptanmıştır.

Barbosa ve ark.'larının 2010'da yaptıkları çalışmada zührevi hastalıklar kliniğine başvuran 767 erkek hastanın ilk akım idrar örneğinde *C. trachomatis* %13,1 oranında pozitif bulunmakla birlikte bu oran bizim çalışmamızdaki orandan yüksektir (226).

Gaydos ve ark.'larının 2003 yılında yaptıkları çalışmada; *C. trachomatis*'in 24 yaş ve altı bayanlarda oluşturduğu komplikasyonların (PİH, ektopik gebelik ve infertilite gibi) ciddi olması ve genellikle asemptomatik seyretmeleri nedeni ile birlikte CDC'nin tavsiyesine göre yılda en az bir kere taranmaları gerekliliğine dikkat çekmişlerdir (227).

Araştırmamız dahilindeki bir diğer mikrobiyolojik etken de gonokoklardır. Bu mikroorganizma için seçici besiyerine gereksinim duyulması ve örnek alımı sırasında non-gonokkal suşlarından da materyal alınan bölgede bulunabilmeleri nedeniyle kültür sonuçları etkilenmektedir (228). Moleküler teknikler, örnek alınan bölgede mikroorganizma sayısının az olması ve hastanın antibiyotik kullanması gibi kültürü zora sokan durumlardan etkilenmemesi nedeniyle gonokokların tanısında önemli bir tekniktir. Bu duruma yönelik yapılan çalışmalarda, PZR ile bakterinin *cppB* gen bölgesine ait 390 bp'lik bölge çoğaltılarak, 500 cfu *N. gonorrhoeae*'nin saptanabileceği gösterilmiştir (150). Ayrıca antibiyotik tedavisi alan hastalarda PZR'nin duyarlılığının değişmemesi (229) de bu yöntemin gonokokların tespitinde kullanılmasında avantajlı olacağını göstermektedir.

Çalışmamızda *N. gonorrhoeae*'yi, kadınlarda %3, erkeklerde %1.8 olmak üzere toplamda %2.3 oranında pozitif olarak saptadık. *Neisseria gonorrhoeae*'nin tespiti için prostat sıvısı, servikal, üretral ve vajinal sürüntü gibi farklı örnek muayene maddeleri kullanılabilir. Ancak bu tür muayene maddeleriyle yapılan karşılaştırmalı çalışmalar idrar örneklerinde duyarlılığının (% 65-93) yüksek olduğunu göstermektedir (238, 243).

Abusarah ve ark.'larının PZR yöntemiyle yaptıkları çalışmada; ilk akım idrar örneklerinde *N. gonorrhoeae* %6.5 oranında (230), Sellami ve ark.'larının gerçek zamanlı PZR kullanarak yaptıkları çalışmada ise %5.8 oranında bulunmuştur (231). Barbosa ve ark.'larının 2010'da yaptıkları çalışmada ise zührevi hastalıklar kliniğine başvuran 767 erkek hastanın ilk akım idrar örneğinde *N. gonorrhoeae* %18,4 oranında tespit edilmiştir (226). Abusarah ve ark.'ları, Barbosa ve ark.'larının ve Sellami ve ark.'larının bulduğu yüzdeler bizim bulduğumuz orandan yüksektir.

Ouzounova-Raykova ve ark.'ları yaptıkları üç yıllık bir çalışmada, PZR ile semptomatik ve asemptomatik 617 bireyde *N. gonorrhoeae* varlığını araştırılmıştır. Bu çalışmada, bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak örneklerin %2.7'sinde *N. gonorrhoeae* tespit edilmiştir (232). Bununla birlikte Oliveira ve ark.'larının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, bizim oranlarımıza nazaran düşük olarak *N. gonorrhoeae* prevalansı %1.2 olarak saptanmıştır (233).

Shafer ve ark.'ları *N. gonorrhoeae* ve *C. trachomatis* tanısı için LZR yöntemini kullandıkları çalışmalarında gönüllü genç kadınlardan aldıkları ilk idrar, evde alınmış vajinal sürüntü ve pelvik muayene sırasında alınan endoservikal sürüntü örnekleri değerlendirilmiştir. Bu etkenlerden herhangi birinin tanımlandığı cinsel yolla bulaşan hastalık prevalansını %14.1 olarak bildirirlerken, *C. trachomatis* prevalansını %11.6, *N. gonorrhoeae* prevalansını da %2.4 olarak tespit etmişlerdir. Gerek *C. trachomatis* gerekse *N. gonorrhoeae* bu üç örnek grubu içerisinde en fazla kendi kendine alınan vajinal örneklerde (sırası ile %81 ve %72) tespit edilmiştir. *C. trachomatis* açısından ikinci en iyi örneğin %72 ile idrar olduğu ve bunu %64 ile endoservikal örneklerin takip ettiği belirtilmiştir. Bununla birlikte *C. trachomatis* için ilk idrar ve vajinal örnek kombinasyonunun başarısının % 94 olduğunu vurgulamıştır (214). Palladinoa ve ark.'larının (234) 1999'da ve Sugunendran ve ark.'larının (235) 2001 yılında yaptıkları çalışmada erkeklerde *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae*'nin neden olduğu genitoüriner sistem infeksiyonlarında idrar ve sürüntü örneklerini PZR yöntemi ile karşılaştırmış ve idrar örneklerinin daha duyarlı ve özgül oldukları bulunmuştur. Quinn ve ark.'ları (236) ile Toye ve ark.'ları (222), 1996 yılında *C. trachomatis*'in neden olduğu genital sistem infeksiyonlarında idrar ve sürüntü örneklerini kullanarak PZR ve ELISA ile kadın ve erkek hastalarda bir karşılaştırma yapmış, idrar örneklerinin non-invaziv, daha duyarlı ve özgül olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamız sonucunda bazı numunelerde birden fazla mikroorganizmanın birlikte pozitif olduğu saptanmıştır. Toplam 351 örneğin 125'inde bir veya birden fazla mikroorganizma saptanırken bu örneklerin 21 (%16,8)'inde iki ya da üç etken birlikte tespit edilmiştir. Bunlardan 10'unda *U. urealyticum* ve *M. hominis*, üçünde *U. urealyticum* ve *C. trachomatis* saptanırken, ikisinde ise *U. urealyticum*, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae*

birlikte saptanmıştır. Altı numunede daha, farklı kombinasyonlarda ikili pozitiflikler saptanmış olup bir numunede de *U. urealyticum*, *C. trachomatis* ve *M. genitalium* birlikte pozitif saptanmıştır. Bu durum değerlendirildiğinde birlikte pozitiflik en sık *U. urealyticum* ile *M. hominis*'te görülmektedir.

Dansuk ve ark.'ları da yaptıkları çalışmada ikili-üçlü pozitiflikler bulmuş olup örneklerin, %6'sında *N. gonorrhoeae* ile *U. urealyticum*, %6'sında *M. hominis* ile *U. urealyticum*, %5'inde *C. trachomatis* ile *N. gonorrhoeae*, %4'ünde *C. trachomatis* ile *U. urealyticum*, %1'inde *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* ve *U. urealyticum*, %1'inde ise *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* ile *M. hominis* birlikte saptanmıştır (237). Afacan ve ark.'ları tarafından, steril piyüri saptanan 461 hastaya ait idrar örneğinde *M. hominis* ve *U. urealyticum* sıklığı araştırılan çalışmada, örneklerin %6.9'unda her iki mikroorganizma birlikte tespit edilmiştir. (202). Dansuk ve ark.'ları ve Afacan ve ark.'larının çalışmalarında, bizim çalışmamızda olduğu gibi *M. hominis* ve *U. urealyticum*'un en fazla birlikte pozitif saptanan ajanlar olduğu görülmektedir (202, 237).

Ülkemizin; tüberküloz açısından endemik bölgelerden biri olması, dünya genelinde yıllık rapor edilen yeni tüberküloz olgularının %20'si ekstrapulmoner yerleşimli olması ve genitoüriner sistem tüberkülozunun en sık görülen ekstrapulmoner tüberküloz bölgesi olması *M. tuberculosis*'in bu çalışmada taranan mikroorganizmalar arasında bulunmasının esas sebebidir (158). Pek çok olguda üriner tüberküloz için yeterli inceleme yapılmadığından olgular atlanmakta veya böbrek fonksiyon kaybının olduğu ileri dönemde tanı koyulabilmektedir (238). Hastaların çoğunda fizik muayenenin normal olması ve olguların %20'sinin asemptomatik olması klinisyenin yanıltılmasına ve tanının gecikmesine neden olmaktadır (239)

Üriner sistem tüberkülozlu hastalarda idrarda ARB sıklıkla negatif olup saprofitik mikobakteriler nedeniyle güvenilir değildir. Kültürde mikobakteri izolasyonu ise aktif tüberkülozun kanıtı olmakla birlikte oldukça geç sonuç vermektedir. Bu nedenle PZR; piyürisi olup üriner sistem tüberkülozundan şüphelenilen hastalarda, hızlı sonuç verebilmesi ve spesifik bir test olması nedeniyle önemli bir testtir (240).

Sıklıkla pollaküri-dizüri, yan ağrısı ve makroskopik hematüri gibi üriner sistem enfeksiyonu bulguları ile başvuran hastaların %93'ünün idrar tetkikinin anormal (%47

piyüri, %12 hematüri, %34 piyüri+hematüri) olması dikkat çekicidir (241). Sistemik semptomların fazla (%77), mikrobiyolojik tanı oranının ise düşük (ARB pozitifliği %20, kültürde üreme %33) olması ise bir başka önemli durumdur (242). Genitoüriner sistem; ekstrapulmoner tüberkülozun en sık görüldüğü bölge olmasına rağmen bu konu ile ilgili çok fazla yayın olmaması ve daha çok olguların raporlanması bu alanda bir boşluk oluşturmaktadır.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bütün hastaların idrarlarında in-house PZR yöntemi ile *M. tuberculosis* varlığı araştırıldı. Ancak hiçbir hastada pozitiflik tespit edilemedi. Bunun nedenini; üriner sistem tüberkülozundan şüphelenilen hastaların idrar numunelerinin ARB, kültür ve PZR işlemi için tüberküloz laboratuvarına gönderilmesi ile ilişkilendirebiliriz. Tüberküloz tanısı olmaksızın steril piyüri varlığında idrarda tüberküloz basilinin PZR ile araştırıldığı başka bir çalışma mevcut olmamakla birlikte, tüberkülozlu hastaların idrarlarında kültür, ARB boyama ve PZR ile *M. tuberculosis*'in arandığı çalışmalar mevcuttur.

Simon ve ark.'larının 1962-1974 yılları arasında 41 aktif üriner sistem tüberkülozlu hastada yaptıkları çalışmada olguların %46'sında piyüri, %34'ünde ise piyüri+hematüri saptanmıştır. %90 olguda ise idrar kültüründe tüberküloz basili saptanmıştır (241). Shamma ve ark.'larının 1982-1987 yılları arasında hastanede takip edilen 48 üriner tüberkülozlu vakada sistemik semptomların çokluğuna (%77) ilaveten mikrobiyolojik tanı oranının düşüklüğüne (ARB pozitifliği %20, kültürde üreme %33) dikkat çekilmiştir (242). Tonbul ve ark.'larının 24 üriner tüberkülozlu hasta idrarında ARB ve kültürle basilin varlığını araştırdığı çalışmada olguların %25'inde ARB, %42'sinde kültür pozitifliği saptanmıştır (239).

Üriner tüberküloz vakalarında en sık rastlanan idrar bulgusunun steril piyüri olması (243) bizi bu mikrobiyolojik ajanın steril piyürlü idrarlarda aramaya yönlendirmiştir. Ancak gelişen tanı yöntemlerine ek olarak klinik olarak da endemik bölgelerdeki şüpheli vakaların erken tansına yönelik idrar örneklerinin özellikle tüberküloz kültürüne yönlendirilmesi mevcut negatif sonucun açıklayıcısı olabilir.

Diğer yandan aktif tüberkülozlu her vakada tüberküloz basilinin izole edilememesinden yola çıkarak, idrarında tüberküloz basili saptanamayan bu hastalarda

steril piyürinin tüberküloza bağlı olmadığını söylemek de mümkün değildir. Bu nedenle şüphelenilen vakalara ek histopatolojik yöntemlerin uygulanması konuyu aydınlatacaktır (239).

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler toplam bir yıllık bir dönemi kapsamaktadır. Bu sayede; etkenlerin cinsiyete, yaş gruplarına, aylara ve mevsimlere göre dağılımının istatistiksel olarak analizi yapılabilmektedir.

Kültür veya PZR yönteminin kullanıldığı birçok çalışmada benzer dahil etme kriterlerine rağmen farklı oranlarda pozitiflik saptanması, çalışmaya dahil edilen popülasyonların seçimi, cinsel davranışa yönelik kültürel ve geleneksel yaklaşım farklılıkları, semptomatik kişilerin hekime başvurma oranları ve yaşanan coğrafya ile ilişkili olabilir. Buna en bariz örnek olarak bizim çalışmamız ve Nassar ve ark.'larının çalışması (Gazze-Filistin) gösterilebilir. Bu çalışmada, prospektif olarak toplanan steril piyüri örnekleri PZR ile değerlendirilmiş ancak bizim çalışmamızda %27.3 olan *U. urealyticum* pozitiflik oranı diğer çalışmada %5 olarak bulunmuştur. Bu durum yaşanan coğrafya ve popülasyon ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda pozitiflik saptanan altı hastanın tekrarlayan idrar örneğinde de (en az 8 hafta sonraki örneklerinde) aynı etkenin tespit edilmesi, hastaların uzun süre bu durum ile yaşamak zorunda kaldıklarını göstermektedir. Bu nedenle semptomatik hastaların tanısına yönelik ek tetkiklerin yapılması ve tespiti durumunda tedavisinin planlanması toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir. Dolayısıyla popülasyon bazında bir karar almak yerine semptomatik hastalarda tedavinin kişiselleştirilmesinin daha iyi olacağı kanısındayız.

Sonuç olarak bulgular bize, steril piyürlü idrarlarda, kültürde saptanmayan önemli sayıda etken mikroorganizmanın PZR tekniği ile saptanabileceğini göstermiştir. Üriner sistem infeksiyonu şikayeti olmasına rağmen; idrarlarında standart kültür yöntemi ile etken saptanamayan hastalarla karşı karşıya gelen klinisyenlere, bu mikroorganizmaların varlığının gösterilmesi tanı ve tedavi açısından çok önemli avantajlar sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmamız sonucunda; 2013 yılı boyunca Enfeksiyon hastalıkları ve Üroloji birimleri tarafından kültür amaçlı gönderilen idrarların %6,26'sında steril piyüri saptanmıştır.
- 2- Bir yıllık çalışma sonucunda *U. urealyticum* %27,9, *M. hominis* %8,3, *M. genitalium* %2, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* %2,3 oranında pozitif bulunmasına rağmen hiçbir örnekte *M. tuberculosis* saptanamamıştır.
- 3- Kadınlarda, *M. hominis* istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- 4- *M. hominis* ve *M. genitalium* 45 yaş ve altı bireylerde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- 5- *U. urealyticum* kış mevsiminde anlamlı derecede düşük saptanırken; şubat, mayıs, haziran, ekim ve kasım aylarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- 6- Geleneksel mikrobiyolojik tanı yöntemleri teoride altın standart olmalarına rağmen uygulamada yonteme yönelik güçlükler ve bildirilen duyarlılığa ulaşamamaları sorun teşkil etmektedir.
- 7- Yapılan çalışmalar ışığında, nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin giderek önem kazanmasında; idrar gibi hastanın kendi kendine alabileceği, non-invaziv örneklerin kullanımına imkan vermelerine ek olarak sonuçların güvenilirliğinden bir şey kaybetmemelerinin payı olduğu kanısındayız.
- 8- Çalışmamız dahilinde araştırılan mikroorganizmaların sebep olduğu komplikasyonlar ve mali kayıpların büyüklüğü göz önüne alındığında; hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntem ile çalışmanın daha uygun olduğunu düşünmekteyiz.

- 9- Mevcut bulgular ışığında steril piyüri saptanan hastalarda bu etkenlerin saptanmasına yönelik hızlı ve duyarlı bir moleküler yöntem olan PZR'nin rutinde kullanıma girmesinin faydalı olacağı kanısındayız.
- 10- Daha büyük hasta gruplarıyla ve daha uzun süreli araştırmaların yapılmasının ülkemiz dinamiklerini öğrenmemiz bakımından faydalı olacağı kanısındayız.

7. ÖZET

STERİL PİYÜRİLİ HASTALARDA *MYCOPLASMA HOMINIS*, *MYCOPLASMA GENITALIUM*, *UREAPLASMA UREALYTICUM*, *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, *NEISSERIA GONORRHOEAE* VE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*'İN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE SAPTANMASI

Amaç: Steril piyüri, enfeksiyonun dolaylı bir belirtici olmakla birlikte sık karşılaşılan bir laboratuvar bulgusudur. Ancak steril piyürinin üriner sistem enfeksiyonu tanısında kullanımını destekleyen çok az veri vardır. *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ve *Mycobacterium tuberculosis*, üriner sistemin çeşitli hastalıkları ile ilişkili olup genellikle rutin mikrobiyolojik testlerle saptanamazlar. Çalışmamızda, steril piyüri hastalarda *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ve *Mycobacterium tuberculosis* varlığını saptamayı amaçladık.

Materyal-Metod: Steril piyüri idrar örnekleri, 1 Ocak-31 Aralık 2013 tarihleri arasındaki süreçte, üçüncü basamak hastanemiz şartlarında toplandı. Bütün örnekler *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* varlığı açısından multipleks PCR kiti(Seeplex® STD6 ACE Detection kit-Kore) kullanılarak, *Mycobacterium tuberculosis* için ise spesifik pirimerler kullanılarak PZR ile test edildi. Malatya İnönü Üniversitesi Hastanesi, Üroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniklerine başvuran 6629 hastadan elde edilen idrar örneklerinin 351'inde steril piyüri saptandı. Analiz için rutin idrar değerlendirmesi yapılp

üreme varlığı açısından eozin metilen blue ve kanlı agar besiyerlerinde kültür işlemi uygulandı. Kültür negatif (24 saat sonrasında belirgin üreme göstermeyen) ve ≥ 10 /HPF (high-power field) lökosit içeren 351 numune (134 kadın, 217 erkek, ≥ 18 yaş) *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* ve *M. tuberculosis* varlığı açısından PZR ile test edildi.

Bulgular: Örneklerin 98'inde (%27,9) *U. urealyticum*, 29'unda (%8,3) *M. hominis*, 7'sinde (%2) *M. genitalium*, 8'inde (%2,3) *C. trachomatis*, 8'inde (%2,3) *N.gonorrhoeae* saptanmıştır. Hiç bir numunede *M. tuberculosis* saptanamamıştır. *M. hominis* kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.03$) derecede yüksek bulunurken, *U. urealyticum* ($p = 0,33$), *M. genitalium* ($p = 1,0$), *N. gonorrhoeae* ($p = 0.487$) ve *C. trachomatis* ($p = 1,0$) açısından iki cinsiyet arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Bununla birlikte *M. hominis* ($p = 0,001$) ve *M. genitalium* ($p = 0.048$) 18-45 yaş arası grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Sonuç: PZR uygulaması, steril piyürili hastalarda çok sayıda *C. trachomatis*, Mikoplazma, Ureaplazma ve gonokok enfeksiyonunun varlığını gösterdi. Sonuç olarak, steril piyürili hastalarda bu mikroorganizmaların tespiti için PZR önerilen bir testtir.

Anahtar kelimeler: Steril piyüri, polimeraz zincir reaksiyonu, idrar örneği

8. ABSTRACT

DETECTION OF *MYCOPLASMA HOMINIS*, *MYCOPLASMA GENITALIUM*, *UREAPLASMA UREALYTICUM*, *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, *NEISSERIA GONORRHOEAE* AND *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN PATIENTS WITH STERILE PYURIA.

Purpose: Sterile pyuria is a common laboratory finding also used as a surrogate marker of infection whereas there is few data supporting its usage in patients. *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Mycobacterium tuberculosis* are associated with various diseases of the urogenital tract, but they are usually not detected by routine microbiological tests. We aimed to determine the occurrence of *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* and *M. tuberculosis* in patients with sterile pyuria.

Material-Method: Urine samples with sterile pyuria were collected during the period between January and December 2013 in our tertiary university hospital. All samples were tested by polymerase chain reaction (PCR) for the presence of *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* using a multiplex PCR kit (Seeplex® STD6 ACE Detection kit- Korea) and *M. tuberculosis* using specific primers. A total of 351 sterile pyuria samples selected from about 6629 urine samples attending the outpatient clinics of Infectious Disease and Urology at Inonu University Hospital, Malatya and were analyzed for routine urine examination and cultured on eosine metilen blue agar and blood agar to detect the presence of these microorganisms. The 351 samples (134

female, 217 male; aged ≥ 18 years) containing more than 10 leukocytes / HPF and negative for culture (showing no significant growth after 24 hr) were tested by PCR for *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* and *M. tuberculosis*.

Results: *U. urealyticum* in 98 samples (27,9%), in 29 samples (8,3%), *M. genitalium* in 7 samples (2%), *C. trachomatis* in 8 samples (2,3%) and *N. gonorrhoeae* was detected in 8 samples (2,3%). *Mycobacterium tuberculosis* was not detected in any sample. The difference in occurrence of *M. hominis* was statistically significant between males and females ($p=0.03$), but insignificant for *U. urealyticum* ($p=0.33$), *M. genitalium* ($p=1.0$), *N. gonorrhoeae* ($p=0.487$) and *C. trachomatis* ($p=1.0$). The results in ages between 18-45 were statistically significant for *M. hominis* ($p=0.001$) and *M. genitalium* ($p=0.048$).

Conclusion: PCR application in samples from patients with sterile pyuria showed a significant number of *C. trachomatis*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* and gonococcal infections. Consequently, PCR is recommended for the detection of those microorganisms in the urine samples of patients with sterile pyuria.

Key words: Sterile pyuria, polymerase chain reaction, urine sample

KAYNAKLAR

1. Özsüt H. İdrar Yolu Enfeksiyonları. Söyletir G., Doğanay, M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1059-64.
2. Kher K.K., Makker, S.P. *Clinical Pediatric Nephrology (second edition)* Singapore: Mc GrawHill; 1992. 277-323.
3. Piemont Y., Jaulhac B. [Value of molecular biology methods for diagnosis in bacteriology]. *Annales de dermatologie et de venereologie*. 1995;122(4):206-12. PubMed PMID: 8526414.
4. Dieter R.S. Sterile pyuria: a differential diagnosis. *Comprehensive therapy*. 2000 Fall;26(3):150-2. PubMed PMID: 10984817.
5. Daxboeck F., Zitta S., Stadler M., Iro E., Krause R. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in patients with sterile pyuria. *The Journal of Infection*. 2005 Jul;51(1):54-8. PubMed PMID: 15979492.
6. Hoton,TM. Practice guidelines for urinary tract infection in the era of managed care. *Int J Antimic Agents*. 1999;11:241.
7. Mamıkoğlu, L., İnan, D. İdrar Yolu Enfeksiyonları.Topçu A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 1487.
8. Baum S., Mycoplasma diseases. Mandell G.L., Bennett, J.E. *Principles and Practice of Infectious Disease*. Dolin, R., New york: churchill livingstone; 2005. 2269.
9. Uuskula A., Kohl P.K., Genital mycoplasmas, including Mycoplasma genitalium, as sexually transmitted agents. *International journal of STD & AIDS*. 2002 Feb;13(2):79-85. PubMed PMID: 11839161.
10. Powell D. Genital mycoplasmas. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18. ed. Behrman, R., K.R., Jenson H, Philadelphia: Saunders; 2007. 1281-2
11. Shah, S. *Ureaplasma urealyticum*. Long, AS. PL., Probe, C. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease*. Elsevier Health Sciences, 2012. Syf.1000.

12. Gibson D.G., Benders G.A., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Baden-Tillson H., Zaveri J., Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome. *Science*. 2008 Feb 29;319(5867):1215-20. PubMed PMID: 18218864.
13. Hartmann M. Genital mycoplasmas. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2009 Apr;7(4):371-7. PubMed PMID: 19500195.
14. Elford W. Ultrafiltration methods and their application in bacteriological and pathological studies. *Br J Exp Pathol*. 1929;10:126.
15. Eaton M.D., Meiklejohn G., Van Herick W., Corey M. Studies on the Etiology of Primary Atypical Pneumonia. Properties of the Virus Isolated and Propagated in Chick Embryos. *The Journal of experimental medicine*. 1945 Oct 31;82(5):317-28. PubMed PMID: 19871503. Pubmed Central PMCID: 2135562.
16. Madoff S. *Introduction to the bacteria L forms*. Madoff S., New York: Marcel Dekker; 1986. 239-240.
17. Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma. Murray P.R., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover R. *Medical Microbiology*. Washington: ASM Press; 1995. 421-426.
18. Waites K., Rikihisa, Y., Taylor-Robinson, D. Mycoplasma and Ureaplasma. Murray P.R., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R. *Medical Microbiology*. Washington DC: ASM press; 2003 972-89.
19. Winn W., Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, PC., Procop, G.W. Mycoplasmas and Ureaplasmas, *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005 1022-1030.
20. Sanchez P.J., Regan J.A. Vertical transmission of Ureaplasma urealyticum in full term infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1987 Sep;6(9):825-8. PubMed PMID: 3670950.
21. Waites K.B., Rikihisa, Y., Robinson, D.T. Mycoplasma and Ureaplasma, Murray P.R., Baron, E.J., Tenoer F.C., Pfaller, M.A., Landry, M.L., Tenover J.H. *Medical Microbiology*. Washington ASM Press; 2007 973-85.

22. Yüce A., Yapar, N. Mikoplazma türleri. Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1453
23. Henrich B., Feldmann R.C., Hadding U. Cytoadhesins of Mycoplasma hominis. *Infect Immun*. 1993 Jul;61(7):2945-51. PubMed PMID: 8514399. Pubmed Central PMCID: 280943.
24. Henrich B., Hopfe M., Kitzerow A., Hadding U. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in Mycoplasma hominis. *J Bacteriol*. 1999 Aug;181(16):4873-8. PubMed PMID: 10438757. Pubmed Central PMCID: 93974.
25. Boesen T., Fedosova N.U., Kjeldgaard M., Birkelund S., Christiansen G. Molecular design of Mycoplasma hominis Vaa adhesin. *Protein Sci*. 2001 Dec;10(12):2577-86. PubMed PMID: 11714926. Pubmed Central PMCID: 2374042.
26. Carson J., Hu, P-C., Collier, A.M. *Cell structural and functional elements*. Maniloff J. Washington DC: ASM Pres; 1992. 63-70.
27. De Silva N.S., Quinn P.A. Endogenous activity of phospholipases A and C in Ureaplasma urealyticum. *Journal of Clinical Microbiology*. 1986 Feb;23(2):354-9. PubMed PMID: 3700618. Pubmed Central PMCID: 268641.
28. Waites K.B., Katz B., Schelonka R.L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005 Oct;18(4):757-89. PubMed PMID: 16223956. Pubmed Central PMCID: 1265909.
29. Küçükler M.A. Mikoplazmalar ve Laboratuvar Tanısı. Ağaçfıdan A., A.Ö. İstanbul: *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No:35* 1999. 175-82.
30. Kenny G.E. Genital Mycoplasmas: Mycoplasma genitalium Mycoplasma hominis, and Ureaplasma species. *Principles and Practice of Infectious Disease*. Mandell G.L., Bennett J., Dolin R. New york: Curchill Livingstone; 2005. 2280.

31. Tsunoe H., Tanaka M., Nakayama H., Sano M., Nakamura G., Shin T. High prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium in female commercial sex workers in Japan. *International journal of STD & AIDS*. 2000 Dec;11(12):790-4. PubMed PMID: 11138913.
32. Shokouhizadeh S., Koksall F., Yarkin F., Uluhan R., Evruke C., Ozturk C. [Incidence of Mycoplasma and group B streptococci in the genitourinary system of pregnant women and their effect on pregnancy]. *Mikrobiyoloji bülteni*. 1992 Jul;26(3):253-60. PubMed PMID: 1528145.
33. Yüce A., Serter, D. Mycoplasma hominis ve Ureaplasma urealyticum'un ürogenital sistem infeksiyonlarındaki insidensi. *İnfeksiyon Dergisi*. 1988;2(1):43.
34. Özsökmen D., Ataoğlu, H., Gülerman, C., Çiçek, N. Fertil ve infertil kadınlarda karşılaştırılmalı genital mikoplazma izolasyonu. *İnfeksiyon Dergisi*. 1993;7(1-2):59.
35. Waites K.B., Rikihisa, Y., Taylor-Robinson, D. Mycoplasma and Ureaplasma. Murray P.R. *Medical Microbiology*. Washington DC: ASM press; 2003. 972-89.
36. Wilson, G., Dick, H.M. Mycoplasmas, ureaplasmas, spiroplasmas, and related organisms. *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology & Immunity*, 7th ed. London: Williams & Wilkins; 1984 799-827.
37. Yüce A., Yapar, N. Mikoplazma türleri. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1453
38. Jensen J.S., Hansen H.T., Lind K. Isolation of Mycoplasma genitalium strains from the male urethra. *Journal of clinical microbiology*. 1996 Feb;34(2):286-91. PubMed PMID: 8789002. Pubmed Central PMCID: 228784.
39. Deguchi T., Yoshida T., Yokoi S., Ito M., Tamaki M, Ishiko H. Longitudinal quantitative detection by real-time PCR of Mycoplasma genitalium in first-pass urine of men with recurrent nongonococcal urethritis. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Oct;40(10):3854-6. PubMed PMID: 12354899. Pubmed Central PMCID: 130874.

40. Dupin N., Bijaoui G., Schwarzing M., Ernault P., Gerhardt P., Jdid R. Detection and quantification of *Mycoplasma genitalium* in male patients with urethritis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003 Aug 15;37(4):602-5. PubMed PMID: 12905147.
41. Yoshida T., Maeda S., Deguchi T., Ishiko H. Phylogeny-based rapid identification of mycoplasmas and ureaplasmas from urethritis patients. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Jan;40(1):105-10. PubMed PMID: 11773101. Pubmed Central PMCID: 120092.
42. Özüpekçe G. Kadınlarda Genital Akıntılarının Mikrobiyolojik Yönden İncelenmesi, SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, *Uzmanlık Tezi*, İstanbul 2000
43. Jensen J.S., Uldum S.A., Sondergard-Andersen J., Vuust J., Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 1991 Jan;29(1):46-50. PubMed PMID: 1993766. Pubmed Central PMCID: 269700.
44. Schaefferbeke T., Renaudin H., Clerc M., Lequen L., Vernhes J.P., De Barbeyrac B. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. *British journal of rheumatology*. 1997 Mar;36(3):310-4. PubMed PMID: 9133961.
45. Fiacco V., Miller M.J., Carney E., Martin W.J. Comparison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital *Mycoplasma* species. *Journal of clinical microbiology*. 1984 Nov;20(5):862-5. PubMed PMID: 6511871. Pubmed Central PMCID: 271460.
46. Seto S., Layh-Schmitt G., Kenri T., Miyata M. Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *Journal of bacteriology*. 2001 Mar;183(5):1621-30. PubMed PMID: 11160093. Pubmed Central PMCID: 95047.

47. Luki N., Lebel P., Boucher M., Doray B., Turgeon J., Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. European Society of Clinical Microbiology. 1998 Apr;17(4):255-63. PubMed PMID: 9707308.
48. Gerbase A.C., Rowley J.T., Heymann D.H., Berkley S.F., Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sexually transmitted infections*. 1998 Jun;74 Suppl 1:S12-6. PubMed PMID: 10023347.
49. Rosebery T. Microbes and morals. *An illustrated history of contraception: a concise account of the quest for fertility control* New York: Viking; 1971, 147.
50. Hook E.W., Handsfield H.H. Gonococcal infections in the adults. Holmes K.K., S.P., Mardh P.A., Lemon S.M., Stamm W.A., Piot P., Wasserheit JN. *Sexually transmitted diseases*, 3rd edUSA: McGraw-Hill companies; 1999. 451–66 .
51. Stamm W.E. *Chlamydia trachomatis infections of the adult*. Holmes K.K., S.P., Mardh P.A., Lemon S.M., Stamm W.A., Piot P., Wasserheit J.N. Sexually transmitted diseases, 3rd ed. USA: McGraw-Hill companies; 1999. 407–22.
52. Egger M., Low N, Smith G.D., Lindblom B., Herrmann B. Screening for chlamydial infections and the risk of ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis. *Bmj*. 1998 Jun 13;316(7147):1776-80. PubMed PMID: 9624063. Pubmed Central PMCID: 28575.
53. Kamwendo F., Forslin L., Bodin L., Danielsson D. Programmes to reduce pelvic inflammatory disease the Swedish experience. *Lancet*. 1998;351 Suppl 3:25-8. PubMed PMID: 9652718.
54. Schachter J, Stamm, W.E. *Chlamydia*. Murray P.R., B.E., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R.H. USA American Society for Microbiology, Washington, DC; 1999. 795–806.
55. Özbal Y. Klamidyalar. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 1999. 705-19.
56. Schachter J. Chlamydiae, *Manuel of Clinical Microbiology*, Fifth edition, Chapter 1051991. 1045-53.

57. Jones R.B., Batteiger, B. Chlamydial Diseases. Mandell G.L., Bennett J., Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. 1986-2003.
58. Fisher M.A. Chlamydia trachomatis genital infections. *The West Virginia medical journal*. 1993 Aug;89(8):331-4. PubMed PMID: 8372472.
59. Reid D. The wide range of chlamydial infection. *British medical journal*. 1987 Jul 18;295(6591):156-7. PubMed PMID: 3115356. Pubmed Central PMCID: 1247022.
60. Fritz H.K., Kurt A.B., Johannes E., Rolf M. Zinkernagel. *Tıbbi Mikrobiyoloji Kitabı*. Mine Anđ Küçüker. Istanbul: Nobel tıp kitabevleri, 9.baskı; 2002. 338-9.
61. Ward M.E., Ridgway G., Chlamydia, *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 1999. 1331-44.
62. Stothard D.R., Williams J.A., Van Der Pol B., Jones R.B. Identification of a Chlamydia trachomatis serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. *Infection and immunity*. 1998 Dec;66(12):6010-3. PubMed PMID: 9826386. Pubmed Central PMCID: 108762.
63. Lovett M., Kuo K.K., Holmes K., Falkow S. "Plasmids of the genus Chlamydia". *Infection and immunity*. 1980;2:1250-2.
64. Albay A., Baylan, O., Kısa, Ö., Doğancı, L. *Klamidya infeksiyonları ve laboratuvar tanı yöntemleri*. Ankara GATA Ayın kitabı; 2003, 192.
65. Öktem M.E. "Chlamydia mikrobiyolojisi ve konak-etken ilişkisi". *XXXI Türk Mikrobiyoloji Kongresi*; (19-23 eylül 2004)2004. 73-4.
66. Baron E.J., Finegold S.M. *Chlamydia, Mycoplasma, and Rickettsia*. Toronto: The CV Mosby Co; 1990. 558-63
67. Albay A., Baylan, O., Kısa, Ö., Dogancı, L. *Klamidya İnfeksiyonları ve Laboratuvar Tanı Yöntemleri*. Ankara GATA Ayın Kitabı; 2003, 210.
68. Bilgehan H. Chlamydiaceae. *Klinik Mikrobiyoloji Özet Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. İzmir: Barış Yayınları; 1994. 461-71.
69. Schachter J. *Chlamydia*. Gorbach S.L., B.J., Blacklow N.R. Philadelphia: WB Saunders Company 1998. 1980-90.

70. Kılıç A. Klamidyalar. Ankara: *T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD., Yardımcı Doçentlik Dersi*; 2002.
71. Spiliopoulou A., Lakiotis V., Vittoraki A., Zavou D., Mauri D. Chlamydia trachomatis: time for screening? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2005 Sep;11(9):687-9. PubMed PMID: 16104982.
72. McClarty G. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends in microbiology*. 1994 May;2(5):157-64. PubMed PMID: 8055179.
73. Zhang J.P., Stephens R.S. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell*. 1992 May 29;69(5):861-9. PubMed PMID: 1591780.
74. Boleti H., Benmerah A., Ojcius D.M., Cerf-Bensussan N., Dautry-Varsat A. Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth. *Journal of cell science*. 1999 May;112 (Pt 10):1487-96. PubMed PMID: 10212143.
75. Grieshaber S.S., Grieshaber N.A., Hackstadt T. Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *Journal of cell science*. 2003 Sep 15;116(Pt 18):3793-802. PubMed PMID: 12902405.
76. Scidmore M.A., Fischer E.R., Hackstadt T. Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the Chlamydia trachomatis inclusion. *The Journal of cell biology*. 1996 Jul;134(2):363-74. PubMed PMID: 8707822. Pubmed Central PMCID: 2120880.
77. Weiss E. Rickettsiae and Chlamydiae. *Taxonomy*. Balows A., Hausler, W.J.Jr, Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. Washington, D.C. *American Society for Microbiology*; 1991. 1033-5.

78. Everett K.D, Bush R.M, Andersen A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International journal of systematic bacteriology*. 1999 Apr;49 Pt 2:415-40. PubMed PMID: 10319462.
79. Ertem E. III. *Ulusal Chlamydia İnfeksiyonları Simpozyumu Program ve Simpozyum Kitabı*. Aktepe O.C., Ağaçfıdan, A. Afyon 2006. 87.
80. Peeling R.W., Brunham R.C. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. *Emerging infectious diseases*. 1996 Oct-Dec;2(4):307-19. PubMed PMID: 8969247. Pubmed Central PMCID: 2639919.
81. Portig I., Goodall J.C., Bailey R.L, Gaston J.S. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003 Jan;10(1):103-7. PubMed PMID: 12522047. Pubmed Central PMCID: 145281.
82. Schachter J. *Chlamydia*. Gorbach S.L., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R. Philedelphia: WB Saunders Company; 1998. 1980-90.
83. Ward M.E. Chlamydial classification, development and structure. *British medical bulletin*. 1983 Apr;39(2):109-15. PubMed PMID: 6347317.
84. Öktem M.E. “Chlamydia mikrobiyolojisi ve konak-etken ilişkisi”. *XXXI Türk Mikrobiyoloji Kongresi*; (19-23 eylül 2004)2004. 73-4.
85. Fredlund 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 : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2004 Nov-Dec;112(11-12):771-84. PubMed PMID: 15638837.
86. Ward M.E., Ridgway, G. *Chlamydia*. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. M.Sussman WJHa, editor1999. 1331-44.

87. Wenman W.M., Meuser R.U. Chlamydia trachomatis elementary bodies possess proteins which bind to eucaryotic cell membranes. *Journal of bacteriology*. 1986 Feb;165(2):602-7. PubMed PMID: 3511037. Pubmed Central PMCID: 214461.
88. (CDC). CfDCaP. *Sexually transmitted disease surveillance*, 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006.
89. Spaargaren J., Fennema H.S., Morre S.A., de Vries H.J., Coutinho R.A. New lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis variant, Amsterdam. *Emerging infectious diseases*. 2005 Jul;11(7):1090-2. PubMed PMID: 16022786. Pubmed Central PMCID: 3371808.
90. Ertem E, Dereli D, Serter D, Yüce K. Screening for *Chlamydia trachomatis* in a Turkish population. *Genitourin Med* 1991; 67(4): 354-5.
91. Eitrem R., Erenius M., Meeuwisse A. Contact tracing for genital Chlamydia trachomatis in a Swedish county. *Sexually transmitted diseases*. 1998 Sep;25(8):433-6. PubMed PMID: 9773438.
92. Washington A.E., Cates W., Wasserheit J.N. Preventing pelvic inflammatory disease. *JAMA:the journal of the American Medical Association*. 1991 Nov 13;266(18):2574-80. PubMed PMID: 1942403.
93. Aka N., A.H., Yazıcıoğlu E. "Chlamydia trachomatis'e bağlı pelvik enfeksiyonların tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin yeri". *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi (logos)* 2003;17(1):48-51.
94. Baron E.J., Finegold, S.M. Chlamydia, Mycoplasma, and Rickettsia. *Bailey Scott's Diagnostic Microbiology*. 8th ed. Toronto: The CV Mosby Co.; 1990. 558-63.
95. Bilgehan H. Chlamydiaceae. *Klinik Mikrobiyoloji Özet Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. İzmir: Barış Yayınları; 1994. 461-71
96. Gökengin D. Chlamydia trachomatis. Cinsel temasla bulaşan hastalıklar. Bölüm 2. Ali Ağaçfidan. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*. 149-53.
97. Chernesky M.A., Chong S., Jang D., Luinstra K., Sellors J., Mahony J.B. Ability of commercial ligase chain reaction and PCR assays to diagnose Chlamydia trachomatis infections in men by testing first-void urine. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Apr;35(4):982-4. PubMed PMID: 9157168. Pubmed Central PMCID: 229716.

98. Stamm W.E., Jones R.B., Batteiger B.E. *Chlamydia trachomatis (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum and Other Genital Infections). Principles and Practice of Infectious Disease*. Mandell GL BJ, Dolin R. PA: Churchill Livingstone; 2005. 2239-56.
99. Ripa K.T., Mardh P.A. Cultivation of Chlamydia trachomatis in cycloheximide-treated McCoy cells. *Journal of clinical microbiology*. 1977 Oct;6(4):328-31. PubMed PMID: 562356. Pubmed Central PMCID: 274768.
100. Budai I. Chlamydia trachomatis: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2007 Mar;54(1):5-22. PubMed PMID: 17523388.
101. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections-2002", Morbidity and mortality weekly report, recommendations and reports [Internet]. 2002.
102. Cles L.D., Bruch K., Stamm W.E. Staining characteristics of six commercially available monoclonal immunofluorescence reagents for direct diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Journal of clinical microbiology*. 1988 Sep;26(9):1735-7. PubMed PMID: 2460495. Pubmed Central PMCID: 266706.
103. Sırmatel F., Sırmatel Ö., Kutlar İ., Yağcı F. Kronik genito-üriner enfeksiyon ve infertil hastalarda Chlamydia trachomatis serovarlarının Mikroimmunofloresans yöntemi ile araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002;27-30.
104. Hatt C., Ward M.E., Clarke I.N. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of Chlamydia trachomatis serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. *Nucleic acids research*. 1988 May 11;16(9):4053-67. PubMed PMID: 2836808. Pubmed Central PMCID: 336574.
105. Van Dyck E., Ieven M., Pattyn S., Van Damme L., Laga M. Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *Journal of clinical microbiology*. 2001 May;39(5):1751-6. PubMed PMID: 11325985. Pubmed Central PMCID: 88020.

106. Land S., Tabrizi S., Gust A., Johnson E., Garland S., Dax E.M. External quality assessment program for Chlamydia trachomatis diagnostic testing by nucleic acid amplification assays. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Aug;40(8):2893-6. PubMed PMID: 12149347. Pubmed Central PMCID: 120684.
107. Sriprakash K.S., Macavoy E.S. Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of Chlamydia trachomatis. *Plasmid*. 1987 Nov;18(3):205-14. PubMed PMID: 3444859.
108. Mahony J.B., Luinstra K.E., Sellors J.W., Chernesky M.A. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1993 Jul;31(7):1753-8. PubMed PMID: 7688753. Pubmed Central PMCID: 265626.
109. An Q., Radcliffe G., Vassallo R., Buxton D., O'Brien W.J., Pelletier D.A. Infection with a plasmid-free variant Chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *Journal of clinical microbiology*. 1992 Nov;30(11):2814-21. PubMed PMID: 1280642. Pubmed Central PMCID: 270534.
110. Goessens W.H., Mouton J.W., van der Meijden W.I., Deelen S., van Rijsoort-Vos T.H., Lemmens-den Toom N. Comparison of three commercially available amplification assays, AMP CT, LCx, and COBAS AMPLICOR, for detection of Chlamydia trachomatis in first-void urine. *Journal of clinical microbiology*. 1997 Oct;35(10):2628-33. PubMed PMID: 9316920. Pubmed Central PMCID: 230023.
111. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clinical microbiology reviews*. 1997 Jan;10(1):160-84. PubMed PMID: 8993862. Pubmed Central PMCID: 172947.
112. Chernesky M.A. Nucleic acid tests for the diagnosis of sexually transmitted diseases. *FEMS immunology and medical microbiology*. 1999 Jul 15;24(4):437-46. PubMed PMID: 10435763.
113. Davies P.O., Ridgway G.L. The role of polymerase chain reaction and ligase chain reaction for the detection of Chlamydia trachomatis. *International journal of STD & AIDS*. 1997 Dec;8(12):731-8. PubMed PMID: 9433945.

114. Guaschino S., De Seta F. Update on Chlamydia trachomatis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;900:293-300. PubMed PMID: 10818417.
115. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what tests should be used for diagnosis of chlamydia infections? *Immunological investigations*. 1997 Jan-Feb;26(1-2):157-61. PubMed PMID: 9037620.
116. Watson E.J., Templeton A., Russell I., Paavonen J., Mardh PA., Stary A. The accuracy and efficacy of screening tests for Chlamydia trachomatis: a systematic review. *Journal of medical microbiology*. 2002 Dec;51(12):1021-31. PubMed PMID: 12466399.
117. Ostergaard L. Microbiological aspects of the diagnosis of Chlamydia trachomatis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2002 Dec;16(6):789-99. PubMed PMID: 12473282.
118. Feavers I.M., Maiden M.C. A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of Neisseria gonorrhoeae. *Molecular microbiology*. 1998 Nov;30(3):647-56. PubMed PMID: 9822829.
119. Tinsley C.R., Nassif X. Analysis of the genetic differences between Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Oct 1;93(20):11109-14. PubMed PMID: 8855317. Pubmed Central PMCID: 38292.
120. Öztürk C. Cinsel Yönden Aktif Kadınlar Ve Genel Kadınlarda 2.Jenerasyon Cinsel Temasla Bulaşan Hastalık Etkenlerinin İnsidansı [*Uzmanlık Tezi*]. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1995
121. Ağaçfıdan A., Özden A. Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıklar. *İstanbul Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Yayını*; 1999. 81.
122. Akan E. *Tıbbi Mikrobiyoloji*: Saray Tıp Kitabevi; 1993. 57.
123. Gürel M., Cengiz, A. T.*Mikrobiyoloji*: Güneş Kitabevi 2004. 382-7; 704-9 .
124. Geo F., Karen C., Janet, S., Stephan, A. *Morse Tıbbi Mikrobiyoloji Lange*: Nobel Tıp Kitabevi 2010. 296-302.

125. Bilgehan H. *Klinik mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 7. baskı izmir: Barış yayınları ve Fakülteler kitabevi; 1992. 245-54.
126. Smith J.M., Smith N.H., O'Rourke M., Spratt B.G. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 May 15;90(10):4384-8. PubMed PMID: 8506277. Pubmed Central PMCID: 46515.
127. O'Rourke M., Ison C.A., Renton A.M., Spratt B.G. Opa-typing: a high-resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoea. *Molecular microbiology*. 1995 Sep;17(5):865-75. PubMed PMID: 8596436.
128. Spratt B.G., Bowler L.D., Zhang Q.Y., Zhou J., Smith, J.M. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species. *J Mol Evol* 1992;34:115–25.
129. Vazquez J.A., Berron S., O'Rourke M., Carpenter G., Feil E., Smith N.H. Interspecies recombination in nature: a meningococcus that has acquired a gonococcal PIB porin. *Molecular microbiology*. 1995 Mar;15(6):1001-7. PubMed PMID: 7623657.
130. Tapsall J. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *World Health Organization (WHO) report*. 2001 Contract No.: WHO/CDS/CSR/DSR/2001.3.
131. Torres M.J., Cano R., Palomares J.C. Evaluation of a DNA probe of plasmid origin for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in cultures and clinical specimens. *Molecular and cellular probes*. 1991 Feb;5(1):49-54. PubMed PMID: 1901956.
132. Lau Q.C., Chow V.T., Poh C.L. Polymerase chain reaction and direct sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* protein IB gene: partial nucleotide and amino acid sequence analysis of strains S4, S11, S48 (serovar IB4) and S34 (serovar IB5). *Medical microbiology and immunology*. 1993 Jul;182(3):137-45. PubMed PMID: 8232067.
133. William M., Charlotte, A. *Klinik Mikrobiyoloji* 9.Baskı Atlas Kitabevi; 2007. 601-20.
134. Jawetz E., Melnick L.J., Adelberg A.E., Brooks G.F., Butel S.J., Ornston N.L. *Medical Microbiology*, Appleton&Lange. 18. ed. California 1989. 239-42.
135. Koneman E.W., Allen S.D., Schreckenberger P.C., Washington C.W. *Diagnostic Microbiology*. Fourth ed: J.B. Lippincott Company, Philadelphia; 1992. 369-404.

136. Morse Stephen A., Holmes King K. Gonococcal Infections. Hoeprich PD, Jordan, *Infectious Diseases*. 4.th ed: Lippincott Company, Philadelphia; 1989. 639-54.
137. Olcay N., Yolsal N. *Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar Tanı ve Tedavi Rehberi*, Yenilenmiş 2. Basım. İstanbul 2002.
138. Fang J., Husman C., DeSilva L., Chang R., Peralta L. Evaluation of self-collected vaginal swab, first void urine, and endocervical swab specimens for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in adolescent females. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2008 Dec;21(6):355-60. PubMed PMID: 19064231. Pubmed Central PMCID: 2653455.
139. Ünal S. Cinsel temasla bulaşan hastalıklar. Kanra G., Akalın, E. "*İnfeksiyon Hastalıkları: Akut bakteriyel Enfeksiyonlara Yaklaşım*" 2. ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 1993. 223-61.
140. Chernesky M.A. *Laboratory services for sexually transmitted diseases: overview and recent developments*. 3th ed. Holmes K.K., Mardh P.A., Lemon S.M., Stamm W.A., Piot P., Wasserheit J.N. USA: McGraw-Hillcompanies; 1999. 1281–94.
141. Martin J.E., Armstrong J.H., Smith P.B. New system for cultivation of Neisseria gonorrhoeae. *Applied microbiology*. 1974 Apr;27(4):802-5. PubMed PMID: 4207764. Pubmed Central PMCID: 380138.
142. Jephcott A.E. Microbiological diagnosis of gonorrhoea. *Genitourinary medicine*. 1997 Aug;73(4):245-52. PubMed PMID: 9389943. Pubmed Central PMCID: 1195851.
143. Johnson R.E., Newhall W.J., Papp J.R., Knapp J.S., Black C.M., Gift T.L. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections 2002. MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control. 2002 Oct 18;51(RR-15):1-38; quiz CE1-4. PubMed PMID: 12418541.
144. Knapp J.S. Historical perspectives and identification of Neisseria and related species. *Clinical microbiology reviews*. 1988 Oct;1(4):415-31. PubMed PMID: 3069201. Pubmed Central PMCID: 358063.

145. Knapp J.S., Koumans E.H. Neisseria and Branhamella. Murray P.R., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R.H. Washington, DC, USA *American Society for Microbiology*; 1999. 586– 603.
146. Roongpisuthipong A., Lewis J.S., Kraus S.J., Morse S.A. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sexually transmitted diseases*. 1988 Oct-Dec;15(4):192-5. PubMed PMID: 3147523.
147. Liebling M.R., Arkfeld D.G., Michelini G.A., Nishio M.J., Eng B.J., Jin T. Identification of Neisseria gonorrhoeae in synovial fluid using the polymerase chain reaction. *Arthritis and rheumatism*. 1994 May;37(5):702-9. PubMed PMID: 8185697.
148. Farrell D.J. Evaluation of AMPLICOR Neisseria gonorrhoeae PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1999 Feb;37(2):386-90. PubMed PMID: 9889224. Pubmed Central PMCID: 84316.
149. Miyada C.G., Born T.L. A DNA sequence for the discrimination of Neisseria gonorrhoeae from other Neisseria species. *Molecular and cellular probes*. 1991 Oct;5(5):327-35. PubMed PMID: 1791853.
150. Ho B.S., Feng W.G., Wong B.K., Egglestone S.I. Polymerase chain reaction for the detection of Neisseria gonorrhoeae in clinical samples. *Journal of clinical pathology*. 1992 May;45(5):439-42. PubMed PMID: 1597525. Pubmed Central PMCID: 495310.
151. Birkenmeyer L., Armstrong A.S. Preliminary evaluation of the ligase chain reaction for specific detection of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of clinical microbiology*. 1992 Dec;30(12):3089-94. PubMed PMID: 1452689. Pubmed Central PMCID: 270593.
152. Carroll K.C., Aldeen W.E., Morrison M., Anderson R., Lee D., Mottice S. Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine and genital swab specimens from a sexually transmitted disease clinic population. *Journal of clinical microbiology*. 1998 Jun;36(6):1630-3. PubMed PMID: 9620391. Pubmed Central PMCID: 104891.

153. Akduman D., Ehret J.M., Messina K., Ragsdale S, Judson F.N. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Jan;40(1):281-3. PubMed PMID: 11773133. Pubmed Central PMCID: 120109.
154. Van Der Pol B., Martin D.H., Schachter J., Quinn T.C., Gaydos C.A., Jones R.B. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for *Neisseria gonorrhoeae* by retesting specimens with equivocal results. *Journal of clinical microbiology*. 2001 Sep;39(9):3092-8. PubMed PMID: 11526134. Pubmed Central PMCID: 88302.
155. Bilgehan H. Mycobacteriaceae. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, 10. Baskı. İzmir: Fakülteler Kitapevi; 2000. 439-89.
156. Bloom B.R., Murray C.J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992 Aug 21;257(5073):1055-64. PubMed PMID: 1509256.
157. Oktun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. *Klinik Dergisi* 2001;14(2):71-82.
158. Lenk S., Schroeder J. Genitourinary tuberculosis. *Current opinion in urology*. 2001 Jan;11(1):93-8. PubMed PMID: 11148753.
159. Kokkayil P., Rawre J., Malhotra N., Dhawan B. Co-infection of *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* in an infertile female patient with genital tuberculosis. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2013 Oct-Dec;56(4):457-9. PubMed PMID: 24441248.
160. Kıyan M. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Cengiz A.T., Ustaçelebi, Ş. Mycobacteriaceae Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 419-57.
161. Goodwin A. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, Third edition. Mahon C.R., Manuselis G. *Mycobacterium tuberculosis* and Other Nontuberculosis Mycobacteria Saunders Elsevier; 2007. 683-717.
162. Baron E.J., Pterson L.R., Finegold S.M. Mycobacteria. Shanahan J.F. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 9 th ed. St. Lois, Missouri: Mosby-Year book; 1994. 590-633.

163. Kocabas A. *Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik Özellikleri*. A. K. Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi; 1991.
164. Babacan F., Över U. Mikobakterilerin genel özellikleri ve Mycobacterium tuberculosis complex. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre İnfeksiyonlar*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002. 1675-90.
165. Köksal F. Farklı bir bakteri topluluğu, mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*. Samsun 2003. 34-46.
166. Iseman M.D., Özkara Ş. *Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu*. İstanbul Nobel Matbaacılık; 2002.
167. Palomino J.C., Cardoso S., Ritacco V. New developments and perspectives. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care*. First Edition. <http://www.tuberculosistextbook.com/index.htm>. 661-680.
168. Elmer W.K., Gail, W., Procop G., Schreckenberger P., Allen S., Janda W. Mycobacterium. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 2005. 1064-1120.
169. Koneman E.W., Winn W.J., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006. 1064-1124.
170. Kıyan M. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 419-37.
171. Özekinci T. Tüberküloz Tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, Fluokrom Boyama Yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein- Jensen Kültür Yöntemlerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi [*Doktora Tezi*]. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi 2000.
172. Gedikoğlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. *İnfeksiyon Dergisi* 1997;11(4).
173. Erturan Z. Kültür ve Serolojik Tanı Yöntemlerinde Yenilikleri. *Mikobakteri Sempozyumu*. Ankara: 2006.

174. Uzun M. Tüberküloz Tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, Fluokrom Boyama Yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen Kültür Yöntemlerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi [Doktora Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi 1994.
175. Lin H.T. The tuberculosis problem and its control in East Asia and the South Pacific Area. İstanbul: *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1986. 28- 39.
176. Özkara Ş. Tüberkülozda güncel durum. XXXVI. Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı. Antalya2010. 34-9.
177. WHO global tuberculosis control. WHO 2010.
178. Çetin M. Tüberküloz basilleri kompleksinin izoniazid ve rifampisin duyarlılıklarının Real-Time PCR (Floresans Rezonans Enerji Transferi) yöntemi ile araştırılması [Doktora Tezi]. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi 2002.
179. Baron E.J., Pterson L.R., Finegold S.M. Mycobacteria. Shanahan J.F. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9 th ed. St. Lois, Missoiri: Mosby-Year book,İnc. 1994. 590-633.
180. Della-Latta P. Digestion-decontamination procedures. Isenberg H.D. *Clinical Microbiology Procedure Handbook*. 2nd ed. Washington DC: ASM Pres; 2004.7.1.2.1.
181. Metchock B.G., Nolte F.S., Wallace R.J. Mycobacterium. Murray P.R., Baron, E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington DC: ASM Press; 1999. 399-437.
182. Palomino J.C.. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *The European respiratory journal*. 2005 Aug;26(2):339-50. PubMed PMID: 16055883.
183. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu; 11-12 Haziran 2003; Samsun.
184. Özakin C., Gedikoğlu S. Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin rolü. 21 Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu; 11-12 Haziran 2003 Samsun.

185. Harris G., Rayner A., Blair J., Watt B. Comparison of three isolation systems for the culture of mycobacteria from respiratory and non-respiratory samples. *Journal of clinical pathology*. 2000 Aug;53(8):615-8. PubMed PMID: 11002766. Pubmed Central PMCID: 1762928.
186. Koneman E.W., Winn W.J., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006. 1064-1090.
187. Özbal Y. Tüberküloz immunolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2006;28:25-34.
188. Yüce A., Şener A. Akciğer Tüberkülozu. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar*. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2008. 832-49.
189. Barış O. Mikobakterilerde Laboratuvar. Mustafa A. *Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı*: Nobel tıp kitabevleri; 2013. 197-209.
190. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı*. Samsun2003. 325-37.
191. Saniç A. Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Yeri. *ANKEM dergisi*. 2007;21:118-27.
192. Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H., Crawford J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*. 1990 May;161(5):977-81. PubMed PMID: 2109022.
193. Sobel J.D., Kaye D. Urinary tract infections. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease*. Philadelphia 2005. 875-905.
194. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay, M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2008. 2003-2018.
195. Clarke M., Maskell R. Gonorrhoea presenting as "sterile" pyuria. *British medical journal*. 1981 Dec 5;283(6305):1546. PubMed PMID: 6799059. Pubmed Central PMCID: 1507898.

196. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*. 6 ed. Murray P.R. 2009. 423.
197. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*. Murray P.R. 2009. 425.
198. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical Microbiology*. Murray P.R. 2009.427.
199. Latthe P.M., Tooze-Hobson P., Gray J. Mycoplasma and ureaplasma colonisation in women with lower urinary tract symptoms. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2008 Jul;28(5):519-21. PubMed PMID: 18850428.
200. Lee S.J., Park D.C., Lee D.S., Choe H.S., Cho Y.H. Evaluation of Seeplex(R) STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2012 Aug;18(4):494-500. PubMed PMID: 22252268.
201. Nassar F.A., Abu-Elamreen F.H., Shubair M.E., Sharif FA. Detection of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis, genitalium and Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in patients with sterile pyuria. *Advances in medical sciences*. 2008;53(1):80-6. PubMed PMID: 18614434.
202. Afacan G., Yılmaz N., Balıkcı E., Mercan F. Steril pyürili hastalarda Mycoplasma hominis ve Ureaplasma urealyticum prevalansı ve antibiyotik duyarlılığı. *ANKEM Derg*. 2007;21:232-6.
203. Taylor-Robinson D., Furr P.M., Webster A.D. Ureaplasma urealyticum causing persistent urethritis in a patient with hypogammaglobulinaemia. *Genitourinary medicine*. 1985 Dec; 61(6):404-8. PubMed PMID: 4086030. Pubmed Central PMCID: 1011870.
204. Taylor-Robinson D. The history of nongonococcal urethritis. Thomas Parran Award Lecture. *Sexually transmitted diseases*. 1996 Jan-Feb;23(1):86-91. PubMed PMID: 8801649.

205. Skerk V., Schonwald S., Krhen I., Markovinovic L., Beus A., Kuzmanovic N.S. Aetiology of chronic prostatitis. *International journal of antimicrobial agents*. 2002 Jun; 19(6):471-4. PubMed PMID: 12135835.
206. Jalil N., Doble A., Gilchrist C., Taylor-Robinson D. Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum*. *Genitourinary medicine*. 1988 Dec; 64(6): 367-8. PubMed PMID: 3224973. Pubmed Central PMCID: 1194268.
207. Sarsar K. Steril Piyürili Hastalarda *Ureaplasma Urealyticum* ve *Mycoplasma Hominis*'in Araştırılması [*Yüksek Lisans*]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2008.
208. Kılıç H.A. Ürogenital sistem enfeksiyonlarında *Ureaplasma urealyticum* araştırılması. *Mikrobiyol Bült.* 1996;30:215-25.
209. Schlicht M.J., Lovrich S.D., Sartin J.S., Karpinsky P., Callister S.M., Agger W.A. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Oct;42(10):4636-40. PubMed PMID: 15472322. Pubmed Central PMCID: 522307.
210. Dabke K., Deodhar L., Gogate A. Incidence of *Ureaplasma urealyticum* in nongonococcal urethritis (NGU). *Journal of postgraduate medicine*. 1986 Apr;32(2):85-6. PubMed PMID: 3761214.
211. Ünal S., Zarakolu I.P. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar ve Genel Özellikleri. Topçu A.W., Söyletir, G., Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 2008.
212. Zarakolu P. Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2005;37:21-34.
213. Zarakolu P., Arman, D., Ünal, S. *Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar ve Tedavisi*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.
214. Shafer M.A., Moncada J., Boyer C.B., Betsinger K., Flinn S.D., Schachter J. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Sep;41(9):4395-9. PubMed PMID: 12958275. Pubmed Central PMCID: 193832.

215. Marrazzo J.M., Johnson R.E., Green T.A., Stamm W.E., Schachter J., Bolan G. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification tests and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Feb;43(2):577-84. PubMed PMID: 15695648. Pubmed Central PMCID: 548082.
216. Mahony J.B., Luinstra K.E., Tyndall M., Sellors J.W., Krepel J., Chernesky M. Multiplex PCR for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary specimens. *Journal of clinical microbiology*. 1995 Nov;33(11):3049-53. PubMed PMID: 8576375. Pubmed Central PMCID: 228636.
217. Çakal B. Servisit ve Üretritli Hastalarda *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* ve *Mycoplasma hominis*'in Arastırılması, [Yüksek Lisans]. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi 1999.
218. Dereli D.E. Ürogenital *Chlamydia trochomatis* Enfeksiyonları. *Mikrobiyoloji Bült.* 1991;25:277-84.
219. Yazar C. Genital sistem sikayetleri olan kadınlarda *Chlamydia trochomatis*, *Mycoplasma hominis* ve *Ureaplasma urealiticum* prevelansı [Uzmanlık tezi]. Ankara: Ankara Numune Hastanesi 1996.
220. Lindan C., Mathur M., Kumta S., Jerajani H., Gogate A., Schachter J. Utility of pooled urine specimens for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in men attending public sexually transmitted infection clinics in Mumbai, India, by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43(4):1674-7. PubMed PMID: 15814983. Pubmed Central PMCID: 1081387.
221. Cosentino L.A., Landers D.V., Hillier S.L. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the amplification control for use with vaginal swab specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Aug;41(8):3592-6. PubMed PMID: 12904360. Pubmed Central PMCID: 179790.

222. Toye B., Peeling R.W., Jessamine P., Claman P., Gemmill I. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men and women by PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 1996 Jun;34(6):1396-400. PubMed PMID: 8735087. Pubmed Central PMCID: 229031.
223. Çicek C. Semptomlu Hastalarda Chlamydia trachomatis İnfeksiyonunun Prevalansı. *Turkish Journal of Infection*. 2006;20(1):27-30.
224. Abaslı H.E. İnfertil hastalardan alınan idrar ve sürüntü örneklerinden real-time PCR yöntemi ile *Chlamydia trachomatis* ve *Mycoplasma hominis* etkenlerinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi; 2007.
225. Ortaylı N.S., Amca B., Say L., Sahip N., Aydın D. Curable sexually transmitted infections among the clientele of a family planning clinic in Istanbul, Turkey. *Sex Transm Dis*. 2001;28(1):58-61.
226. Barbosa M.J., Moherdaui F., Pinto V.M., Ribeiro D., Cleuton M., Miranda A.E. Prevalence of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection in men attending STD clinics in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010 Sep-Oct;43(5):500-3. PubMed PMID: 21085857.
227. Gaydos C.A., Quinn T.C., Willis D, Weissfeld A., Hook E.W., Martin D.H. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in female urine and endocervical swab specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jan;41(1):304-9. PubMed PMID: 12517865. Pubmed Central PMCID: 149571.
228. Ridderhof J.C., Vaughan M., Tinney A., Meier F.A., Dalton H.P.. Two confirmatory tests for identification of Neisseria gonorrhoeae from primary culture. *Journal of clinical microbiology*. 1990 Mar;28(3):619-20. PubMed PMID: 2108998. Pubmed Central PMCID: 269678.
229. Tabrizi S.N., Lees M.I., Garland S.M. Comparison of polymerase chain reaction and culture techniques for detection of Chlamydia trachomatis. *Molecular and cellular probes*. 1993 Oct; 7(5):357-60. PubMed PMID: 8264669.

230. Abusarah E.A., Awwad Z.M., Charvalos E., Shehabi A.A. Molecular detection of potential sexually transmitted pathogens in semen and urine specimens of infertile and fertile males. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013 Dec;77(4):283-6. PubMed PMID: 24079950.
231. Sellami H., Znazen A., Sellami A., Mnif H., Louati N., Zarrouk S.B. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and other sexually transmitted bacteria in semen of male partners of infertile couples in Tunisia: the effect on semen parameters and spermatozoa apoptosis markers. *PloS one*. 2014;9(7):e98903. PubMed PMID: 25019616. Pubmed Central PMCID: 4096407.
232. Ouzounova-Raykova V., Jordanov D., El-Tibi M., Mitov I. Gonococcal infection in symptomatic and asymptomatic persons seeking medical clinics in Sofia--a 3-year study 2008-2010. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2011 Dec; 119 (12) : 864-7. PubMed PMID: 22085362.
233. Oliveira F.A., Pflieger V., Lang K., Heukelbach J., Miralles I., Fraga F. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007 Sep;102(6):751-6. PubMed PMID: 17924006.
234. Palladino S., Pearman J.W., Kay I.D., Smith D.W., Harnett G.B., Woods M. Diagnosis of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Genitourinary infections in males by the Amplicor PCR assay of urine. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1999 Mar;33(3):141-6. PubMed PMID: 10092961.
235. Sugunendran H., Birley H.D., Mallinson H., Abbott M., Tong C.Y. Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital Chlamydia trachomatis infection in male patients. *Sexually transmitted infections*. 2001 Dec;77(6):423-6. PubMed PMID: 11714940. Pubmed Central PMCID: 1744395.

236. Quinn T.C., Welsh L., Lentz A., Crotchfelt K., Zenilman J., Newhall J. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachomatis infection in urine samples from women and men attending sexually transmitted disease clinics. *Journal of clinical microbiology*. 1996 Jun;34(6):1401-6. PubMed PMID: 8735088. Pubmed Central PMCID: 229032.
237. Dansuk Z.B., Gürbüz O.A., Demiray T., Çagatay M., Mert A. Üretral akıntı şikayeti ile başvuran hastalarda Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum ve Mycoplasma hominis etkenlerinin sıklığının araştırılması. *Flora*. 2002;7:252-6.
238. Rubin H.C., Tolkoff-Rubin N.E. Urinary tract infection, pyelonephritis and reflux nephropathy. *The Kidney*. Brenner BM. Philadelphia: WB Saunders; 1996. 1638-1639.
239. Tonbul H., Selçuk Y., Özbey İ. Üriner tüberkülozlu 24 olguya ait klinik özellikler. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 2002;11(4):218-22.
240. Corigliano B.E.L. *Textbook Nephrology*. Massry S.G.G. Baltimore: Williams-Wilkins; 1995. 41-43.
241. Simon H.B.W., Pasternak M.S., Swartz M.N., Kunz L.J. Genitourinary tuberculosis. *The American Journal of Medicine*. 1977;63:410-20.
242. Shammaa M.Z.H., Al-Asfari R., Siragel-Din M.N. Urinary tuberculosis: Experience of a teaching hospital in Syria. *International Urology and Nephrology*. 1992;24(5):471-80.
243. Garcia-Rodriguez J., Munoz Bellido J.L. Genitourinary tuberculosis in Spain: review of 81 cases. *Clinical Infect Dis*. 1994;18(4):557-61.