

# Atipik Pnömoni Etkeni *Chlamydia* Cinsinden Mikroorganizmaların Laboratuvar Tanısı

Ali Ağaçfıdan

## Giriş

*Chlamydia* cinsinden mikroorganizmalar hareketsiz ve iki farklı karakteristik yaşam siklusu gösteren hücre içi patojenlerdir. Bu mikroorganizmanın konak hücreyi infekte eden şekline "elementer cisimcik", hücre içinde gelişim gösteren ve inklüzyon oluşturan yapıya ise "retiküler cisimcik" adı verilmektedir. Elementer cisimcik küçük olup boyutları yaklaşık 0.3 µm çapında, retiküler cisimcikler ise 0.8-1.2 µm çapındadırlar. Hücre içinde her iki oluşum arasında gelişme gösteren yapılara da rastlamak mümkündür (1).

Bu mikroorganizmalar yapılan son sınıflandırmaya göre *C. trachomatis*, *C. psittaci* ve *C. pneumoniae* olarak üç türde toplanmıştır (2).

*C. trachomatis* infekte anneden doğum esnasında bebeğe geçmekte ve yenidoğanda inklüzyon konjunktiviti, otitis media ve pnömonilere neden olmaktadır. Ayrıca trahom, ürogenital infeksiyonlar ve lymphogranuloma venereum bu mikroorganizmanın oluşturduğu önemli hastalıklar arasındadır (1,2).

*C. psittaci* kuşlarda papağan ve c psittaci, papağan ve muhabbet kuşu gibi kuşlarda psittakoz; kümes hayvanlarında (tavuk, hindi, ördek vb.) ornitozdenilen hastalık tablolarını oluşturmaktadır. Hastalık bu hayvanlarda genellikle latent şekilde seyretmektedir. Bu hayvanların salgı ve dışkı tozlarının insana bulaşması sonucu infeksiyon meydana gelmektedir. İnsandan insana bulaşma damlacık infeksiyonu yolu ile çok nadir olarak görülmektedir (2-4).

*C. pneumoniae* akut alt solunum yolu infeksiyonlarından sıklıkla sorumlu tutulmaktadır (5-9). Ayrıca bu mikroorganizma toplumda edinilmiş veya hastane pnömonilerinin etkeni olarak bildirilmiştir. İlk kez bu mikroorganizma Taiwan'da bir çocuğun gözünden (TW-183 suşu), daha sonra Amerika'da bir öğrencinin boğaz salgısından (AR-39 suşu) izole edilmiştir. Daha sonra Taiwan ve Amerika'da izole edilen suşların ilk harfleri birleştirilerek TWAR adı ortaya atılmıştır. Bu suşlar önceleri *C. psittaci*'nin alt türleri olarak düşünülmüş, daha sonra yapılan çalışmalarda aralarında farklı karakteristik özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

*Chlamydia* cinsinden bulunan üç türün göstermiş oldukları farklı karakteristik özellikler Tablo 1'de gösterilmiştir (5). Muayene maddelerinde türler arasında bu ayırt edici özelliklerin belirlenmesinde kullanılan tanı yöntemleri arasında bazı farklılıklar bulunmakta birlikte, prensipte aynıdır.

Bu yöntemler; hücre kültürü, antijen tayin yöntemleri, sitoloji ve yeni yöntemler olarak sınıflandırılabilir.

## Hücre Kültürü:

*Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında en iyi ve güvenilir metod (gold standard) olarak kabul edilen bu yöntemin duyarlılığı izole edilmek istenen *Chlamydia* türüne göre değişmektedir (1,10). Ayrıca bu testin duyarlılığını ve özgüllüğünü etkileyen birtakım faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler hücre kültüründe eikenin izolasyon şansını artırmakta ya da azaltmaktadır. İzolasyonda en önemli faktörlerden biri muayene maddesinin alındığı

**Tablo 1. *Chlamydia* Cinsinden Mikroorganizmaların Göstermiş Oldukları Bazı Karakteristik Özellikler**

Özellikler	<i>C.pneumoniae</i>	<i>C.psittaci</i>	<i>C.trachomatis</i> Trahom/LGV
DNA homolojisi (Referans: <i>C.pneumoniae</i> )	100	10	10
DNA'daki G+C oranı	40	41	41/42
Plazmid	-	+	+
Serovar sayısı	1	8	12/3
Elementer cisimcik morfolojisi	Armut şeklinde	Yuvarlak	Yuvarlak
Inklüzyon morfolojisi	Oval, kesif	Değişken, kesif	Oval, vakuoler
Inklüzyonda glikojen oluşumu	-	-	+

bölgenin yerinin iyi bilinmesi ve uygun şekilde alınmasıdır. *Chlamydia* pnömonilerinde trakeal ve/veya bronşlardan aspirasyonla alınan örnekler ya da biyopsi materyali uygun muayene maddesini teşkil etmektedir (5,11). Epitel hücreleri tarafından zengin materyal *Chlamydia* pnömonisinin tanısında önemli bir faktördür. *Chlamydia* lara bağlı üst solunum yolu infeksiyonlarında ve bazı durumlarda pnömoni olgularında nazofarinksten alınan sürüntüler de uygun muayene maddesini oluşturmaktadır. Nazofarinks sürüntülerinin alınmasında pamuk, dakron'ya da rayon uçlu ektüvyonlar kullanılmaktadır. Kullanılan ektüvyon çubuklarının tahta olması hücre kültür ortamına toksik etki oluşturmaktadır. Bu nedenle plastik olanlar önerilmektedir (1). Yenidoğan infeksiyonlarında görülen *Chlamydia* pnömonisinde trakeo-bronşiyal ya da nazofarinksten alınan örneklerin uygun koşullarda laboratuvara iletilmesi oldukça önem taşımaktadır. Alınan muayene maddesinin *Chlamydia* için toksik olmayan bakteri ve mantarları inhibe eden uygun antimikotik ve antibakteriyel ihtiva eden transport ortamında laboratuvara iletilmesi gerekmektedir. Alınan muayene maddesinin transport ortamında +4°C'de saklanması ve en geç üç gün içinde ekilmesi gerekmektedir. Eğer ekim için daha uzun süre gerekiyorsa, alınan örneğin -70°C'de dondurularak saklanması idealdir.

*C.trachomatis* üretiminde en çok kullanılan hücre tipi McCoy hücreleridir. Ayrıca HeLa-229, BHK21 gibi hücreler de tanıda kullanılmaktadır. Bu hücrelerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri, 2mM L-glutamin % 5-10 fetal sıgır serumu ihtiva eden temel Eagle (MEM-Eagle) besiyeridir. Bu besiyerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında değişmektedir (1). *Chlamydia* izolasyonunda kullanılan hücreler lamel içeren tüplere (shell vials) ya da kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilmektedir.

*C.trachomatis*'in izolasyonunda kullanılan besiyeri 0.05 M glikoz ihtiva eden ve ekim yapılan hücrelerin çoğaltılmasında da kullanılan besiyeridir. Besiyerinin 0.5-1.0 µg/ml sikloheksimid ihtiva etmesi, hücrelerin tek tabaka teşkil etmesini sağlamakta, birden fazla hücre tabakasının oluşmasını önlemektedir. Ayrıca ekim yapılan hücrelerin 2500-3000 devirde santrifüj edilmesi *Chlamydia*'nin inokülasyonunu kolaylaştırmakta ve değerlendir-

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünooloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul  
Atipik Pnömonilerin Laboratuvar Tanısında Yenilikler Simpozyumu (25 Mart 1994, İstanbul)'nda bildirilmiştir.

me süresini kısaltmaktadır (1).

*C.trachomatis*'in infekte hücrelerde boyanması Giemsa, iyod ya da fluorezan boyama yöntemleri ile yapılmaktadır. *C.trachomatis*'in hücrelerde oluşturduğu inklüzyonlar glikojen vakuoller içerdiğinden, kolaylıkla iyod ile boyanırlar. Oldukça basit ve maliyeti ucuz olan bu boyama yöntemi birçok laboratuvarında tercih edilmektedir. İyod ya da Giemsa yöntemleri, bazı durumlarda non-spesifik boyamalara neden olabileceğinden sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olabilir. Bu nedenle deneyimli kişilerin sonucu değerlendirmesi önem taşımaktadır. Fluorezan boyama yöntemi daha duyarlı ve özgül olduğundan, elde edilen şüpheli sonuçların doğrulanmasında genellikle başvurulmaktadır (1,2).

*C.psittaci*'nin izolasyonu oldukça zordur. Muayene maddesinin örneğin balgamın antibiyotik ile muamele edilerek daha sonra maleryalin farelere inoküle edilmesi ya da embriyonlu yumurtanın sarı kesesine ekilmesi ile *C.psittaci* üretilmektedir. Ayrıca hücre kültürü ile izolasyon mümkündür. Fakat bu yöntemler uygulanım güçlükleri nedeni ile rutin laboratuvarında tercih edilmemektedir. *C.psittaci* infeksiyonlarının kesin tanısında serolojik yöntemler önemli yer tutmaktadır (1).

*C.pneumoniae*'nin hücre kültürü ile izolasyonu yapılmaktadır. *C.trachomatis* için uygun hücre tipi McCoy hücreleri iken, *C.pneumoniae* için uygun hücre serisi HeLa-229 ya da Hep2 hücreleridir (2,10,12). Bazı araştırmacılar ise HL, McCoy, HeLa-229 ve BHK21 gibi hücrelerle yaptıkları çalışmalarda, *C.pneumoniae*'nin izolasyonunda en uygun hücre serisini HL olarak belirlemişlerdir (13). Ayrıca hücrelerin inokülasyon öncesi dietilaminoetil dekstran ile muamele edilmesinin infektiviteyi yaklaşık 2.5 kez daha artırdığı saptanmıştır (14).

*C.pneumoniae*'nin izolasyonunda muayene maddesinin transportu da oldukça önem taşımaktadır. TWAR suşlarının canlılık düzeyini belirleyen bir çalışmada SPG *Chlamydia* transport besiyeri kullanılmış (75 gr sukroz, 0.52 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.22 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.72 gr glutamik asid içeren 1 litre H<sub>2</sub>O, pH 7.4-7.6) oda ısısında (22°C'de) 24 saat sonunda, suşların % 1'inin canlı kaldığı belirlenmiştir (14). Suşlar +4°C'de bekletildikten 24 saat sonra % 70'inin canlı kaldığı, ancak suşlar +4°C'de 4 saat bekletildikten sonra -75°C'de muhafaza edildiğinde, sadece % 23'ünün inaktive olduğu görülmüştür.

*Chlamydia*'nin hücre kültüründe, boyama işleminde fluorezan boyama güvenilir bir yöntemdir. Bu amaçla, cinse spesifik ve türe spesifik fluorezan işaretli konjugeler kullanılmaktadır (1). Bugün piyasada *C.trachomatis* ve *C.pneumoniae* için ticari fluorezan konjugeler bulunmaktadır. Ayrıca *C.trachomatis* ile *C.pneumoniae*'nin ayırıcı tanısında iyod ile boyama yöntemi de kullanılabilir. *C.pneumoniae* inklüzyonları glukojen vakuoller içermediğinden bu boyama ile negatif sonuç alınmaktadır.

*C.trachomatis*'in tanısında lipopolisakarid ya da majör dış membran proteinine (MOMP) karşı hazırlanmış konjugeler kullanılmaktadır.

#### Sitolojik Değerlendirme

Bu yöntem genellikle laboratuvar olanaklarının yetersiz bulunduğu durumlarda kullanılmaktadır. Alınan muayene maddesinin *Chlamydia* açısından sitolojik değerlendirilmesi, ancak deneyimli kişilerin sonucu yorumlaması ile mümkün olmakta ve tanıda alınacak başarı artmaktadır (2).

#### Antijen Tayin Yöntemleri

Hücre kültürü yöntemi *Chlamydia* tanısında en iyi ve kesin metod olarak kabul edilmekle birlikte, yukarıda belirtilen tüm koşulların eksiksiz olarak uygulanması ile gerçekleştirilmektedir.

Uygulanması oldukça zahmetli görünen ve maliyeti pahalı olan hücre kültürünün yerini son yıllarda tanıda iki farklı antijen tayin yöntemi almıştır (1,2): Enzim immunoessay (EIA) ve direkt fluorezan antikor testi (DFA)

**EIA:** Birden fazla muayene maddesinin incelenmesine olanak sağlayan bu testin duyarlılığı % 67-90, özgüllüğü % 92-97 arasında değişmektedir. Ancak sonucun başarısı, muayene maddesinin yeterli bir şekilde alınmasına bağlıdır. Ayrıca kullanılan kitin kalitesi bir diğer önemli faktördür. Bu amaçla hazırlanmış birçok ticari kit bulunmaktadır. Muayene maddelerinde saptanan *Chlamydia* antijeni çoğunlukla cinse spesifik monoklonal antikorlar ile aranmaktadır. Bu da doğal olarak saptanan antijenin hangi *Chlamydia* türüne ait olduğunu belirlememektedir. Ancak muayene maddesinin alındığı yer ve klinik değerlendirme sonucu, etken *Chlamydia* türünün belirlenmesine önemli faktörü oluşturmaktadır.

**DFA:** Nazofarinksten alınan sürüntüler ve trakeo-bronşiyal aspirasyon sıvıları uygun muayene maddesini oluşturmaktadır. Trakeo-bronşiyal aspirasyon sıvıları yaklaşık 10 dakika 1500 devirde santrifüje edilmekte, daha sonra dipte kalan çökelti lamlara tespit edilerek incelenmektedir (Dr. Stense Farholt, Bireysel yazışma, Statens Serumistitut, Kopenhag, Danimarka).

Bazı bakteriler tanıda kullanılan antikorları bağladığından fluorezan oluşturabilmektedir. Bu gibi durumlarda elemanter cisimciklerin morfolojileri önem taşımaktadır. *C.pneumoniae* 'de belirlenen elemanter cisimcik morfolojisi armut şeklinde iken, *C.psittaci* ve *C.trachomatis*'te bu morfoloji yuvarlaktır. Bu özellik, türlerin birbirinden ayrılmasında önemli bir kriterdir (5). Ayrıca *Chlamydia*'nin hazırlanan preparatlarda etken olarak belirlenmesi için en az 10 veya daha fazla sayıda elemanter cisimcik belirlenmesi gerekmektedir (15).

EIA ve DFA testlerinde kullanılan işaretli spesifik konjugeler *Chlamydia* lipopolisakarid antijenine (cinse özgü) ya da MOMP'a karşı (türe özgü) hazırlanmıştır.

Bu amaçla piyasada hazırlanmış birçok ticari kit bulunmaktadır. Ancak bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü kullanılan reaktiflerin kalitesine göre değişmektedir. Tabii buna bağlı olarak da testlerin maliyeti artmaktadır.

#### Serolojik Yöntemler

*Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında serolojik tanı yöntemleri infeksiyonun özelliğine ve etken türe göre farklılık göstermektedir (1,2). Hasta serumlarında *C.trachomatis* 'e karşı spesifik IgG antikorlarının belirlenmesi, epidemiyolojik çalışmaların değerlendirilmesinde önem taşımaktadır. Özellikle yenidoğan *C.trachomatis* pnömonilerinde muayene maddesinin alınımı zor olduğundan serolojik tanı önemli yer tutmaktadır. Hasta serumlarında mikroimmünfluoresans (Mikro-IF) ile 1/32 ya da daha yüksek titrede spesifik IgM antikorlarının belirlenmesi aktif infeksiyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (2).

Mikro-IF yönteminde değişik serovarları ihtiva eden *C.trachomatis* ile *C.psittaci* ve *C.pneumoniae* antijenleri nokta şeklinde ve gruplar halinde lama tespit edilmektedir. Bu antijenlere karşı hasta serumlarında spesifik IgM ve IgG antikorlarının varlığı fluorezan işaretli konjugeler yardımıyla saptanmaktadır (16). Mikro-IF testi ayrıca hücre kültüründe izole edilen suşun hangi serovar ya da türe ait olduğunu belirlemede de kullanılmaktadır. İzole edilen suşlar lama nokta şeklinde ve gruplar halinde tespit edilmekte, daha sonra fareden hazırlanmış monoklonal antikorlar ile fluorezan mikroskopta incelenmektedir.

*C.psittaci* infeksiyonlarının tanısında ise serolojik tanı oldukça önemlidir. Tanıda *C.psittaci*'ye karşı hasta serumlarında spesifik antikorları belirleyen ticari kitler mevcuttur. Ancak Mikro-IF yöntemi psittakozun tanısında da oldukça duyarlı ve özgül bir testtir. Ayrıca kompleman birleşmesi deneyi psittakozun tanısında önemli bir testtir. Bu testte kullanılan antijen tavuk embriyosunda üretilmekte, daha sonra organik çözücüler ile muamele edilerek hazırlanmaktadır. Kompleman birleşmesi testi psittakozun yanı sıra lymphogranuloma venereum'un tanısında da önemli yer tutmaktadır Psittakozda antikor titrasyonunda görülen farklı za-

**Tablo 2. TWAR infeksiyonlarında Mikro-IF Testinin Yorumu**

Akut infeksiyon	: 4 kat antikor titre artışı IgM $\geq$ 1:16 IgG $\geq$ 1:512
Geçirilmiş infeksiyon	: IgG $\geq$ 1:16 ve < 1:512

manlarda alınan dört misli artış, muhtemel infeksiyonun varlığını göstermektedir. Hasta serumunda alınan ilk örnekte 1/64 veya daha yüksek titrede saptanan antikor, tanı için önemli bir göstergedir. Bu titrasyon 1/32'den düşük ise klinik olarak anlam taşımamaktadır (2). *C.psittaci* infeksiyonlarında serolojik tanı değerlendirilirken hastanın anamnezi ve infeksiyonun oluşmasında rezervuar rolü oynayan hayvanların hasta ile ilişkisinin bilinmesi tanıda önemli bir faktördür.

*C.pneumoniae* infeksiyonlarının serolojik tanısında ise yine mikro-IF testi güvenilirdir. Ancak sonucun yorumlanmasında iki faktör gözününde bulundurulmalıdır. Bu faktörlerden birincisi hastanın infeksiyonu ilk kez geçirip geçirmediği; diğeri ise daha önce geçirilmiş bir infeksiyonun yeniden nüks etmesinin (re-infeksiyon) bilinmesidir (5). Hasta serumlarında spesifik IgM antikorları infeksiyondan yaklaşık üç hafta sonra oluşmaktadır. Spesifik IgG ise infeksiyon başlangıcından yaklaşık 6-8 hafta sonra

oluşmaktadır. Reinfeksiyonlarda ise spesifik IgM düşük titrede ya da hiç saptanmamaktadır. Buna karşılık, spesifik IgG 1-2 hafta içinde oluşmaya başlayıp hızlı bir şekilde antikor titrasyonunda artış görülmektedir (Tablo 2).

#### Yeni Yöntemler

Hibridizasyon tekniği, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve son olarak ligaz zincir reaksiyonu (LCR) *Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yöntemler arasında yer almaktadır. Hibridizasyon tekniği maliyetinin pahalı olması nedeniyle rutin amaçla kullanım alanı sınırlı bir yöntemdir. Tanıda radyoaktif işaretli problemlerin kullanılması da bu testin seçilmesinde diğer olumsuz etkilerden biridir. Ayrıca son yıllarda radyoaktif olmayan problemlerin kullanıldığı ticari kitler hazırlanmış olup, hücre kültürü ile karşılaştırmalı yapılan bir çalışmada duyarlılığının % 89-95 olduğu bildirilmiştir (2). PCR (17) ve LCR (18) muayene maddelerinde çok düşük oranda bulunan *Chlamydia* genetik materyalini enzim ve primerler yardımıyla saptanabilir hale getiren ve son yıllarda popüleritesi artan önemli yöntemler arasında bulunmaktadır. Ancak her iki testten alınabilecek başarının oranı, laboratuvar şartlarının (mali problemi çözülmüş donanımlı bir laboratuvar ve eğitimli laboratuvarcılar) uygun olmasına bağlıdır. *Chlamydia* infeksiyonlarının tanısında yeni kullanım alanına giren PCR ve LCR testlerinden elde edilen sonuçlar oldukça ümit vericidir.

#### Kaynaklar

- Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 119-36
- Schachter J. Chlamydial infections. *West J Med* 1990; 153: 523-34
- Schachter J. Chlamydial infections past, present, future. *JAMA* 1989; 195: 1501-6
- Schachter J, Grossman M, Sweet RL, Holt J, Jordan C, Bishop E. Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis*. *JAMA* 1986; 255: 3374-7
- Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. *Chest* 1989; 95: 664-9
- Saikku P. The epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). In: Mardh P A, Saikku P, eds. *Chlamydial Infections of the Genital and Respiratory Tracts and Allied Conditions*. Gummerus Kirjapaino Oy: Jyväskylä, 1991: 56
- Jantos C, Artelt P, Schiefer HG. Acute lower respiratory tract infection associated with *Chlamydia pneumoniae* in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 33-5
- Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J. A new *Chlamydia psittaci* strain called TWAR from acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 1986; 315: 161-8
- Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin M, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, Smith P, Schachter J. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 178-82
- Ripa KT, Mardh PA. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 328-31
- Tack KT, Rasp FL, Hanto D, Peterson PK, O'Leary M, Simmons RL, Sabath LD. Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the lower respiratory tract of adult. *Lancet* 1980; 1: 116-20
- Roblin PM, Dumornay W, Hammerschlag MR. Use of HEP-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1968-71
- Cles LD, Stamm WE. Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 938-40
- Kuo C-C, Grayston JT. Factors affecting viability and growth in Hela 229 cells of *Chlamydia sp.* strain TWAR. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 812-5
- Syva Micro Trak. The Chlamydial organism, its detection and species-mer collection. *Syva Company (Tanum Broşürü)* Palo Alto, CA, 1988
- Dwyer RSTC, Trehan JD, Jones BR, Herring J. *Chlamydia* infection. Results of microimmunofluorescence tests for the detection of type-specific antibody in certain chlamydial infections. *Br J Vener Dis* 1972; 48: 452-9
- Gaydos CA, Roblin PM, Hamerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter J, Quinn TC. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 903-5
- Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 729-31