

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAAMNİOTİK ENFEKSİYONLAR VE GEBELİK
KOMPLİKASYONLARINDA GENİTAL
MİKOPLAZMALARIN, *MYCOPLASMA HOMINIS* VE
UREAPLASMA UREALYTICUM'UN POTANSİYEL ROLÜ**

Mik. Uzm. Fesem BAŞARI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2018

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNTRAAMNİOTİK ENFEKSİYONLAR VE GEBELİK
KOMPLİKASYONLARINDA GENİTAL
MİKROPLAZMALARIN, *MYCOPLASMA HOMINIS* VE
UREAPLASMA UREALYTICUM'UN POTANSİYEL ROLÜ**

Mik. Uzm. Fesem BAŞARI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK.
2016/5797 Nolu proje ile desteklenmiştir**

ADANA-2018

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“İntraamniotik Enfeksiyonlar ve Gebelik Komplikasyonlarında Genital Mikoplazmaların, *M. hominis*
ve *U. urealyticum*’un Potansiyel Rolü”
adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

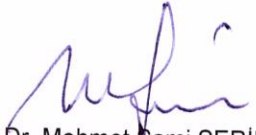
Tarihi: 15 / 01 / 2018

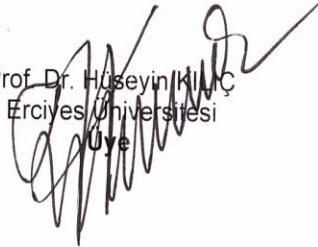
TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Fügen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Selim BÜYÜKKURT
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ
Erciyes Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 15/01/2018

İMZA

Adı Soyadı: Fesem BAŞARI

Kayıtlı olunan Program : Doktora
Tezin Konusu : İntraamniotik Enfeksiyonlar ve Gebelik Komplikasyonlarında Genital Mikoplazmaların, *M. hominis* ve *U. urealyticum*'un Potansiyel Rolü

Tezin Türü : Yüksek Lisans: ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 0 322 338 6046

E-Posta : fkoks@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 0 322 3383482(3480)

E-Posta : fesemb@yahoo.com

Adresi : Ç.Ü. Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın gerçekleşmesinde yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgisi, tecrübesi ve sabrıyla çalışmalarına yardımcı olan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, çalışmamızın gerçekleştiği Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Selim BÜYÜKKURT'a, eğitimimin her basamağında bilgi ve alakalarını esirgemeyen Anabilim Dalımız öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve sayın Prof. Dr. M. Macit İLKİT'e ve ayrıca örneklerin alınmasında yardımcı olan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve personellerine, bu çalışmamda yardımcı olan Dr. Melda MERAL'e, tez çalışmam sırasında verdikleri destek ve motivasyonları için başta Anabilim Dalı sekreterimiz Suna GÖKMEN olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma, bugüne kadar her konuda destek ve sevgileriyle daima yanımda olan ve benden sonsuz desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Yeter'e, canım evlatlarım Başar, Kağan ve Bahar ile anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Mikoplazmaların Tanımı ve Taksonomisi	3
2.2. Morfolojisi, Yapısı ve Fizyolojisi	5
2.3. Patogenezi, Antijenik Yapısı ve Virulans Faktörleri	6
2.4. Yaptığı Hastalıklar	9
2.5. Laboratuvar Tanısı	12
2.5.1. Kültür	13
2.5.2. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri	13
2.6. Gebelikte Tedavi	16
2.7. Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri	17
2.8. Epidemiyoloji	17
2.9. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Önlenmesi ve Aşılar	18
2.10. <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
2.10.1. Laboratuvar Tanısı ve Tedavisi	21
2.11. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	22
2.11.1. Laboratuvar Tanısı ve Tedavisi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Reagenler	26
3.1.1. Sodyum Fosfat Solüsyonu (PBS)	26
3.1.2. 10x Tris-EDTA (TE) Solüsyonu	26
3.1.3. 10x Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Solüsyonu	26

3.1.4. Master Mix Karışımı	27
3.1.5. Etidyum Bromid	27
3.1.6. DNA Marker	27
3.2. Örneklerden DNA Ekstraksiyonu	27
3.2.1. İdrar Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	27
3.2.2. Endoservikal ve Vajinal Sürüntü Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu ve Numune Hazırlama	28
3.3. Örneklerin Toplanması ve Transportu	28
3.3.1. Transport Besiyerleri	29
3.3.1.1. <i>M. hominis</i> Selektif Transport Besiyeri	29
3.3.1.2. <i>U. urealyticum</i> Selektif Transport Besiyeri	30
3.3.2. İzolasyon Besiyerleri	30
3.3.2.1. <i>M. hominis</i> Selektif İzolasyon Besiyeri	30
3.3.2.2. <i>U. urealyticum</i> Selektif İzolasyon Besiyeri	30
3.3.3. Dienes Boyama Metodu	31
3.4. Fenotipik İdentifikasyon	31
3.5. Moleküler İdentifikasyon	32
3.5.1. Kültür Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	33
3.5.2. In-House PCR ile <i>M. hominis</i> 16S rRNA Varlığının Araştırılması	33
3.5.3. In-House PCR ile <i>M. genitalium</i> 16S rRNA Varlığının Araştırılması	34
3.5.4. In-House PCR ile <i>U. urealyticum</i> 16S rRNA Varlığının Araştırılması	34
3.5.5. In-House PCR ile <i>M. hyorhina</i> 16S-23S rRNA Varlığının Araştırılması	35
3.5.6. In-House PCR ile <i>C. trachomatis</i> Cryptic Plasmid 16S rRNA Varlığının Araştırılması	36
3.5.7. In-House PCR ile <i>N. gonorrhoeae</i> 16S rRNA Varlığının Araştırılması	36
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1a-1b. Dienes boyası ile boyanmış mikoplazma kolonileri	39
Şekil 4.2. <i>M. hominis</i> 'in 16S rRNA PCR sonucunda elde edilen band görüntüleri	41
Şekil 4.3. <i>M. genitalium</i> 16S rRNA PCR sonucunda 427bp'de elde edilen band görüntüleri	41
Şekil 4.4. <i>U. urealyticum</i> 16S rRNA PCR sonucunda 247bp'de elde edilen band görüntüleri	41
Şekil 4.5. <i>C. trachomatis</i> 16S rRNA PCR sonucunda 241bp'de elde edilen band görüntüleri	43
Şekil 4.6. İki aşamalı 16S-23S rRNA PCR sonucu <i>M. hominis</i> 236bp'de band görüntüleri	45
Şekil 4.7. <i>VspI</i> enzimi ile kesim sonrası 113 ve 123bp büyüklüğündeki <i>M. hominis</i> band görüntüleri	45
Şekil 4.8. <i>M. hominis</i> <i>arl</i> ve <i>goiB</i> pozitif ve negatif örneklerin PCR görüntüsü	46



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Mikoplazmaların taksonomisi	4
Tablo 2.2. İnsanlardan izole edilen mikoplazmalar ve ureaplazmalar	8
Tablo 3.1. In-House PCR yönteminde kullanılan primerler	32
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen gebelerin yaş grupları ve gestasyon yaşlarına göre dağılımı	38
Tablo 4.2. Selektif katı besiyerlerinde görülen üremelerin örneklere dağılımı	40
Tablo 4.3. Sıvı transport besiyeri ve üretme amaçlı katı besiyerinden hazırlanan DNA ekstraktlarında PCR ile hedef mikroorganizma DNA dizilerinin pozitiflik oranları dağılımı	42
Tablo 4.4. Gebelerden izole edilen çoklu mikroorganizmaların dağılımı	44
Tablo 4.5. İlk gebelik ve daha önce düşük öykülerine göre mikroorganizmaların PCR pozitif sonuçların dağılımı	44
Tablo 4.6. Gebelerden izole edilen <i>M. hominis</i> 'lerde <i>arl</i> , <i>goiB</i> ve <i>goiC</i> dağılımı	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CYBH	Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar
DFA	Direkt Floresan Antikoru
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EIA	Enzim Immüno Assay
HIV	Human ImmunodeficiencyVirus
IL	İnterlökin
LGV	Lenfoganüloma Venerum
MOMP	Major Dış Membran Proteini
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NGU	Non-Gonokokkal Üretrit
PID	Pelvik İnflamatuvar Hastalıklar
PPLO	Pleuro Pneumoniae-Like Organism
PPROM	Preterm Prematüre Membran Rüptürü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TNF	Tümör Nekroz Faktör

ÖZET

İntraamniotik Enfeksiyonlar ve Gebelik Komplikasyonlarında Genital Mikoplazmaların, *M. hominis* ve *U. urealyticum*'un Potansiyel Rolü

İntrauterin enfeksiyonlar başta preterm doğum olmak üzere erken membran rüptürü, düşük tartılı doğum, intrauterin ölü doğum ve spontan abortus gibi gebelik anomalilerinin en önemli sebepleri arasındadır. *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* gibi cinsel yolla bulaşan patojenlerin yanı sıra *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* ve *Ureaplasma urealyticum* gibi bazı mikoplazma tür ve genotiplerinin de üst genital organlara translokasyon göstererek özellikle gebelerde gebelik anomalilerine yol açtıkları çeşitli araştırmacılar tarafından iddia edilmiştir. Son yıllarda bazı özel *M. hominis* suşlarının plasental bariyeri geçerek fetal membranlara adeze olduğu ve enfeksiyon oluşturdıklarının gösterilmesi, dikkati bu mikroorganizmalara yeniden yoğunlaştırmıştır. Çalışmamızda, preterm doğum ve gebelik komplikasyonları ile *M. hominis* ve membran rüptüründen sorumlu olduğu düşünülen *arl*, *goiB* ve *goiC* genlerini ve *U. urealyticum* arasındaki muhtemel ilişkiyi, kültür ve PCR ile araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya ≤ 34 hafta erken membran şüphesi bulunan 61 gebenin servikal, vajinal sürüntü ve idrar numuneleri ile ≤ 34 hafta gebeliği olan 21 sağlıklı gebenin örnekleri dahil edildi. Mikoplazma suşlarının doğrulaması PCR-RFLP yöntemi ile 16S-23S rRNA spacer bölge primerleri ve *VspI-HindIII* enzimleri kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR yöntemi ile *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* varlığı araştırıldı.

Kültür yöntemi ile 61 hastanın %9.8'inde mikoplazma ve %8.2'sinde ureaplazma, kontrol grubunun %9.5'inde mikoplazma ve ureaplazma üretildi. Spesifik primerler kullanılarak 61 hastanın %39.3'ünde *M. hominis*, %4.9'unda *M. genitalium*, %31.1'inde *U. urealyticum* ve %16.4'ünde *C. trachomatis*, kontrol grubunda sırası ile; %14.3, %9.5, %14.3 ve %38.0 tespit edildi. İdrar örneklerinde hedef DNA band profili gösterilemedi. *M. hominis*'in 16S-23S rRNA spacer bölge dizilerini çoğaltarak elde edilen amplikonlar, *VspI* enzimi ile kesilerek 113bp ve 123bp'deki band profilleri gösterildi. Hasta grubunda *M. hominis*'in tespit edildiği iki gebede *arl* ve kontrol grubunda bir gebede *arl* ve *goiB* pozitifliği tespit ettik. *goiC* hedef dizileri hiçbir gruptaki gebede tespit edemedik.

Mikoplazma ve ureaplazmanın preterm doğum üzerindeki etkisi hala tam olarak kavranmamıştır. Daha fazla sayıda vaka ile daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: *arl*, *goiB*, *goiC*, *Mycoplasma hominis*, Preterm doğum

ABSTRACT

The Potantial Effect of Genital Mycoplasmas such as *M. hominis* and *U. urealyticum* in Intraamniotic Infections and Complicated Pregnancy

Intrauterine infections are among the most important causes of gestational abnormalities especially including preterm birth, premature rupture of membranes, low weighted births, intrauterine stillbirth and spontaneous abortion. Sexually transmitted pathogens such as *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* such as several mycoplasma species and genotypes, such as *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*, have also been claimed by various researchers to translocate into upper genital organs, leading to pregnancy anomalies in pregnancies. In recent years, some specific *M. hominis* strains have been shown to cross placental barriers, adhere to fetal membranes and make infection so these results have intensified the attention on these microorganisms. In our study, it was aimed to investigate the possible association preterm delivery amog *M. hominis* and *arl*, *goiB* and *goiC* genes, which are thought to be responsible for membrane rupture in *M. hominis* strains and *U. urealyticum* by using culture and PCR methods.

Cervical, vaginal swabs and urine specimens of 61 pregnant women who had suspected premature rupture of membranes in ≤ 34 weeks gestational age and samples from 21 healthy pregnant with gestational age of ≤ 34 weeks were used in the study. Confirmation for the mycoplasma strains was conducted by PCR-RFLP method by 16S-23S rRNA spacer regions primers and *VspI* -*HindIII* enzymes. The presence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* was investigated by PCR using DNA extraction from the specimens.

Mycoplasma in 9.8% patients and ureaplasma in 8.2% patients were produced and mycoplasma and ureaplasma in 9.5% pregnant women of control group by culture. By using of specific primers were found *M. hominis* in 39.3%, *M. genitalium* in 4.9%, *U. urealyticum* in 31.1% and *C. trachomatis* in 16.4% of total 61 patient. In the control group, these organisms were; 14.3%, 9.5%, 14.3% and 38.0% respectively. Target DNA band profile was showed in none of the pregnant urine specimens. Amplicons obtained by amplifying 16S-23S rRNA spacer region sequences of *M. hominis*, after digestion with *VspI* enzyme and specific band profiles were visualized at 113 bp and 123 bp. Concerning the presence of genes, *arl* of *M. hominis* was detected in two pregnant women in the patient group and *arl* and *goiB* genes positivity in a control group participant, but *goiC* target sequences could not be detected in any group.

The effect of mycoplasma and ureaplasma on preterm birth is still not fully comprehended. Further studies are needed with more cases.

Key Words: *arl*, *goiB*, *goiC*, *Mycoplasma hominis*, Preterm birth

1. GİRİŞ

Doğum kilosuna bakılmaksızın bir gebenin 20. ve 37. haftalar arasında doğumun gerçekleşmesine preterm doğum denilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) ve *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*)'un sebep olduğu vajinal enfeksiyonların preterm doğum için risk faktörü olabileceği açıklanmıştır. *M. hominis* ilk defa 1937'de Bartholin bezi absesinden izole edilmiş ilk insan mikoplazma izolatıdır. *U. urealyticum* 1954'de bir erkek genital sisteminden izole edilmiştir (1-3).

Mikoplazmalar serbest yaşayan en küçük prokaryot canlılardır ve rijid bir hücre duvarı yerine üç tabakalı bir eksternal membrana sahiptirler, bu durum onları hücre duvarını hedef alan antibiyotiklere karşı dirençli hale getirmektedir. Primer olarak insan ürogenital bölgesine yerleşen *M. hominis* ve *U. urealyticum* hem kadın hem de erkeklerde patojenite gösterirken, sağlıklı bireylerin ürogenital sisteminde asemptomatik olarak da yüksek prevalansa sahiptir (2,4,5). Bu bakteriler vajinal floranın en yaygın üyelerindendir, genel olarak zararsız olarak görülmelerine rağmen, gebelerde inflamasyon ile seyreden intraamniotik enfeksiyon, erken membran rüptürü ve spontan preterm abortus etkeni olarak bilinmektedir. *M. hominis* fetüs ve yenidoğana vertikal geçiş göstermekte solunum, nörolojik ve septik tabloları da içine alan diğer sistemik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Her üç preterm doğumdan birisi amniotik ve diğer etkenlere nazaran erken doğum için en yüksek riski *M. hominis*'in oluşturduğu gösterilmiştir (1-6).

Cinsel yolla bulaşan hastalıklar (CYBH)'ın en yaygın bakteriyel etkenlerinden ilk *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) ve ikinci sırada *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) gelmektedir. Dünyada, her yıl yaklaşık 131 milyon yeni *C. trachomatis* ve 78 milyon *N. gonorrhoeae* enfeksiyonu vakası ortaya çıkmaktadır. *C. trachomatis* enfeksiyonlarının üçte ikiden fazlası gelişmekte olan ülkelerdedir. Kadınlarda pelvik inflamatuvar hastalık (PID), kronik pelvik ağrı, ektopik gebelik, maternal bulaşma ve kısırılık, erkeklerde epididimit, prostatit ve üretral darlık oluşturabilirler (2,7,8).

Vajinal ve intrauterin örneklerde bakterinin 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA)'i hedef alan incelemelerle *M. hominis*'in erken doğum ve bakteriyel vajinoz ile ilişkili olduğu da doğrulanmıştır. Virulans genlerindeki farklılıklar mikroorganizmanın belirli bir bölgeye yerleşme ve enfeksiyon oluşturma potansiyelini belirlemektedir. *M.*

hominis suşların karşılaştırmalı genom sekans analizleri ile incelenmesi sonucunda *M. hominis*'in bazı suşlarının amniyotik kaviteden çıkışını kolaylaştıran genetik virulans faktörlerine sahip olduğu ve böylece erken doğumu tetiklediği Allen-Daniels et al. tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada ilk defa **arl** (alanine racemase), **goiB** ve **goiC** (gene of interest B ve C) hedef bölgelerinin önemi araştırılmış, **arl** ve **goiB** istatistiki olarak preterm doğum ile ilişkili bulunmazken, özellikle **goiC**'nin erken membran rüptürü görülen tüm gebe izolatlarında bulunduğu ve istatistiki olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. **goiC** geninin vajinal sürüntü örneklerine nazaran amniyotik sıvı ve plasentadan üretilen suşlarda bulunması, bu genin *M. hominis*'in plasentaya kolonizasyondan sorumlu olabileceğini, amniyotik sıvı ve plasentaya kolonizasyonda diğer bakterilerle karşı avantaj kazandırdığı düşündürmüştür (6).

Membran rüptürü görülen hastaların amniyotik sıvı/plasentasından izole edilen *M. hominis* izolatlarında bulunan genler, referans PG21 suşunun genleri ile karşılaştırılmış ve bu suşlarda farklı olarak **arl**, **goiB** ve **goiC** olmak üzere 3 genin bulunduğu belirlenmiştir. **arl**'nin kodladığı alanin rasemaz enzimi L-alanini peptidoglikanın bir bileşeni olan D-alanine dönüştürür. Mikoplazmalarda peptidoglikan tabakası yoktur, ancak bazı türlerde kodlandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte alanin rasemaz enziminin mikoplazmalardaki fonksiyonu henüz açık değildir (6). Diğer genlerden **goiB** ve **goiC** ilk defa Allen-Daniels et al. (6) tarafından mikoplazmalarda gösterilmiştir. **goiB** fonksiyonu tam olarak bilinmeyen 379 aminoasitlik bir sekrete proteini kodlamaktadır ve bir sinyal peptidine sahip olduğu gösterilmiştir. **goiC**'nin kodladığı proteinin herhangi bilinen bir proteine benzerliği bulunamamıştır. Amniyotik sıvı/plasenta izolatları çoklu direkt repeatlere sahiptir. Bu üç genin görüldüğü izolatlarda nt 547 ve 1884 nt tekrarları sergilenmektedir.

Çalışmamızda erken doğum şüphesi bulunan gebelerin amniyon sıvısı ve vajinal sürüntü örneklerinde *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. hyorhins*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* varlığının sorgulanması ve bu hastaların idrar örneklerinde *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* araştırılması ve izole edilen *M. hominis* suşlarında erken membran rüptüründen sorumlu olduğu düşünülen **arl**, **goiB** ve **goiC**'nin araştırılması amaçlandı. Çalışmamız ile *M. hominis*'in bu özel popülasyondaki insidansı ve ülkemizde ilk defa amniyona invazyonda etkili olarak erken doğuma neden olan virulans genleri araştırılmış oldu.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Mikoplazmaların Tanımı ve Taksonomisi

Mycoplasma (Yunanca mykes; mantar ve plazma; oluşmuş) terimi, ilk olarak plöropnömoni benzeri hastalık yapan mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılmıştır. *Mycoplasmataceae* ailesinde bulunan *Mycoplasma* cinsine ait olan ilk bakteri, 1898 yılında Nocard ve Roux isimli Fransız araştırmacılar tarafından plöropnömoni hastalığına sahip olan sığırların plevra boşluğundan alınan seröz sıvılardan izole edilmiştir. Sığırlarda ölümle sonuçlanabilen bu hastalık etkenini araştırmacılar zenginleştirici besiyerinde üretmeyi başarmışlardır. Daha sonra sağlıklı veya hasta hayvanlardan, toprak, su gibi doğal ortamlardan saprofit ya da patojen olarak, benzer mikroorganizmalar izole edilmiştir. Fakat bulunan ilk bakteriye benzerliklerinden dolayı Pleuro Pneumoniae Like Organism (PPLO) olarak adlandırılmışlardır (2,4,9).

M. hominis direkt olarak insandan ilk defa 1937 yılında Bartholin bezlerindeki apsedan izole edilmiştir. Penisilin ve sülfonamidlerin 1940’larda kullanılmasından sonra, bu antibiyotiklere cevap vermeyen pnömoniler görülmeye başlanmıştır. Eaton et al. 1944 yılında solunum yolu numunelerinde bulunan ve bakteriyel filtrelerden geçebilen bir etkeni primer atipik pnömoni etkeni olarak bildirmişlerdir. Eaton ajanı adını verdikleri bu etken, 1961 yılında *Mycoplasma* olarak tanımlanmıştır (3,10,11).

Shepard 1954 yılında erkek genital sisteminden ureaplazmaları izole etmiştir. *U. urealyticum*’u mikoplazmaların T-suşu (Tiny-strain; çok küçük suş) olarak isimlendirmiştir. Bu bakteri 1960’lı yıllara kadar bakterilerin L formlarından ayırt edilememiştir. Ribozomal RNA analiz sonuçları *Mollicuteslerin* *Basillus*, *Laktobasillus*, *Clostridium*, *Erysipelotrix* ve *Streptococcus* bakterileriyle yakın akraba olduklarını göstermiştir. Hücre duvarları olmamasına rağmen, canlı hücrelerin dışında hayatlarını sürdürebilen en küçük bakterilerdir. Memelilerde, kuşlarda, böceklerde ve bitkilerde hastalık oluşturabilmektedirler. Deoksiribonükleik asit (DNA) yapıları, besin ihtiyaçları, metabolik olayları, antijenik yapıları ve konak cinsleri arasında farklar bulunmaktadır. Buna göre *Mollicutes* sınıfı 4 takım, 5 aile, 8 cins ve 16 türü insanlardan izole edilmiş olan toplamda 200’den fazla türden meydana gelmektedir (Tablo 2.1) (2,3,4,9,12).

Hücre duvarları olmadığından dolayı diğer bakterilerden kesin olarak ayrılmaktadırlar. Kendi aralarında zorunlu anaerop ya da fakültatif anaerop üremelerine ve sterol ihtiyaçlarına göre sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırmaya göre, fakültatif anaerop ya da mikroaerofilik üreyen bakterilerden *Mycoplasma*, *Ureaplasma* ve *Spiroplasma* cinsleri sterole ihtiyaç duyarken, *Acholeplasma*'lar sterolsüz ortamda üreyebilirler. Zorunlu anaerop grupta bulunan *Anaeroplasmata*'lar sterollü ortamda ürerken, *Asteroplasmata*'lar sterole ihtiyaç duymazlar. Mikoplazmalar, üreme ortamındaki kompleks lipid kolesterol ihtiyaçlarına göre sınıflandırılabilir (Tablo 2.1) (2,3,9).

Tablo 2.1. Mikoplazmaların taksonomisi (2)

Takım	Aile	Cins	Sterol ihtiyacı	Habitat	Optimal Üreme ısı (°C)
<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	+	İnsan, hayvan	35-37
		<i>Ureaplasma</i>	+	İnsan, hayvan	35-37
<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>	+	İnsekt, bitki	30
		<i>Mesoplasma</i>	-	İnsekt, bitki	30
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>	+	İnsekt, bitki	30-37
<i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>	-	Hayvan, insekt, bitki	30-37
<i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasmata</i>	+	Sığır, koyun	anaerop
		<i>Asteroplasmata</i>	-	Sığır, koyun	anaerop

Mikoplazmaların bazı türleri ve ureaplazmalardan *U. urealyticum* ve *U. parvum* insanların klinik örneklerinde bulunur. *M. pneumoniae* trakea-bronşit, pnömoni gibi solunum yolu hastalıklarına neden olur. *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* ise çoğunlukla genital sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bu türler ve insanda kolonize olan diğer mikoplazma türleri birçok hastalıkla ilişkilidir, fakat çoğu hastalıktaki etyolojik rolleri henüz tam açıklığa kavuşmamıştır (Tablo 2.2) (2,4,9,13).

Tüm mikoplazma türleri glikolitik yolu kullanarak, substrat seviyesindeki fosforilasyonla ve burada görev alan iki enzimi; fosfoglisarik asit kinaz ve piruvat kinaz ile glikozu piruvata dönüştürerek adenozintrifosfat (ATP) üretirler. Bu iki enzim *Mollicutes* sınıfı için ATP sentezinin en önemli kaynaklarıdır (2,9,13).

2.2. Morfolojisi, Yapısı ve Fizyolojisi

Pleomorfik özelliğe sahip bu bakteriler; yuvarlak, yıldız, armut şeklinde dallanmalar yapan filamentöz yapıya kadar çeşitlilik gösterebilirler. Beslenme ortamının özelliğine ve osmotik basınca göre şekilleri farklılık gösterdiğinden 450 nm çapındaki membran filtrelerden geçebilirler. Flagella ya da pilileri yoktur. Hücre duvarları olmadığından dolayı Gram boyama yöntemi ile de boyanmazlar (2,4,9,13).

Mikoplazma ve ureaplazmalar, serbest olarak yaşayan en küçük bakterilerdir. Diğer bakterilerden, hücre duvarlarının olmaması ve hücre membranlarının 8-10 nm kalınlığında üç tabakalı sterol bulundurması nedeniyle farklıdır. L formundaki bakteriler, mikoplazmalardan farklı olarak hücre membranlarında sterol içermezler ve uygun üreme koşulları olduğunda hücre duvarlarını yeniden oluştururlar. Hücre duvarlarının olmamasından dolayı; penisilin, sefalosporin, vankomisin ve diğer hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı dirençlidirler (2,9,13).

İkiye bölünerek çoğalırlar ve bu aşamada, genetik çoğalma ile sitoplazmanın bölünmesi eş zamanlı olmadığı için, sitoplazmada tomurcuklanma ya da boncuk dizisi gibi görünüm oluşturan membranöz organeller ve ribozomlar içerirler. Mikoplazma genomu yuvarlaktır ve çift iplikçikli DNA molekülüne sahiptir. Bilinen kendini eşleyebilen en küçük hücredir. Sıkı sarmala sahip çembersel kromozomları vardır. mRNA ve tRNA da vardır. Genomları oldukça küçüktür, mol ağırlığı, 500 MDa'dur. Düşük G + C oranına sahip olması nedeni ile diğer prokaryotlardan ayrılırlar. Mikoplazmaların genetik bakımdan düşük G + C içeren, Gram pozitif bakterilerin soyundan geldiği düşünülmektedir. Ribozomal RNA (rRNA) analizleri sonucunda, *Clostridium* cinsi bakteriler ile benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Duvar sentezi ve pürin sentezi gibi birçok metabolik fonksiyonlara sahip değillerdir. Bu özellik biyosentez yeteneğinin sınırlı olduğunu ve üreyebilmek için zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duyduklarını göstermektedir. Laboratuvarıda üretilibilmeleri için serum proteinleri, sterol ve lipoprotein ile zenginleştirilmiş besiyerleri gerekir (2,4,9,13).

Zorunlu aerob olan *M. pneumoniae* hariç, mikoplazmalar fakültatif anaerob bakterilerdir. Hücre membranlarında %65 oranında bulunan sterolü oluşturabilmeleri için, ortamda hayvan serumundan sağlanan sterole gereksinim duyarlar. Mikoplazmalar yavaş üreme gösterirler, jenerasyon süreleri 1 – 6 saat kadardır. Koloni merkezde daha

yoğun ve agarın derinliğine doğru, periferde ise agarın yüzeyinde üremesinden dolayı çoğu küçük koloniler sahanda yumurta görünümündedir. Ureaplazmaların kolonileri ise 10 – 25 µm çapında oldukça küçük kolonilerdir ve kolonilerinin küçüklüğü nedeniyle T-suşları olarak da adlandırılırlar (2,4,9,13).

2.3. Patogenezi, Antijenik Yapısı ve Virulans Faktörleri

Mollicutes'ler genellikle memeliler ile kuşlardan izole edilmekle birlikte bitki ve böceklerde de bulunurlar (Spiroplasma). Memelilerin mukoz membranlarında kolonize olurlar. Bu tür membranlar, özellikle genitoüriner ve ororespiratuvar yollarda bulunmaktadır. Çoğunlukla saprofit mikroorganizmalardır. Konjunktiva, salgı bezleri ve dış kulak yolunda bulunurlar. *Mycoplasmataceae* ailesi hücre duvarına sahip olmadığından dolayı önemli antijenik determinantlarını membran glikolipidleri ve proteinleri oluşturur. Bu antijenler diğer bakterilerle ve insan dokularıyla çapraz reaksiyon verir (2,4,9,13).

Mikoplazmalar yüzeysel infeksiyonlar oluşturup, çok az kan ve dokulara karıştığı için, hücre yüzeyine yapışma özelliğine (adhere) sahip oldukları düşünülmüştür. Sıklıkla mukoz membrana yapışmaktadırlar ve özgül reseptör proteinleri tanımlanmıştır. Türlerine göre dokuda hastalık meydana getirmeleri değişir. Örneğin *M. neurolyticum* nörotoksin salgılamakta, *M. mycoides* galaktan salgılamakta ve hücrenin dış yüzeyini çökerterek hücreye girmektedir. Ayrıca bazı mikoplazma ve *Acheoplasma* türleri de endotoksin aktivitesine yol açabilen moleküller oluşturabilirler ve hastalıklarda patogenezi yönlendirebilirler. Mikoplazmalara ait metabolitler de (hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve enzimler) doku hasarı oluşturmaktadırlar (2,4,9,13).

Mikoplazma ve ureaplazma esas olarak epitel hücreleri ile yakın bir ilişki içinde olan, konakçı solunum ve ürogenital yolunda bulunan mukozayla ilişkili bakterilerdir, ancak ekstraselülerdir. İnsan patojeni mikoplazmaların keşfedilmiş olan bazı potansiyel virulans faktörleri ve patojenitesini açıklayan bazı mekanizmalar bildirilmiştir. Bunlar arasında kompetitif inhibisyon, hücrelere yapışma, hücre membranlarına füzyon, hücre işgali ve sitotoksisite yer alır. Kolonizasyonun ve enfeksiyonun başlatılmasından sorumlu sitoadherens proteinleri olan P50 ve P100 *M. hominis*'de gösterilmiştir ve bu iki yüzey polipeptidi bu türlerin ökaryotik hücrelere yapışması işlevini görürler. *M. hominis* ayrıca sülfatlanmış glikolipidleri, organizmaların yüksek molekül ağırlıklı

dekstran sülfat ile ön inkübasyonu ile inhibe edilebilen, zaman, sıcaklık ve doza bağımlı bir şekilde bağlar. Rekombinant P50 proteininin HeLa hücrelerine bağlanması da yüksek molekül ağırlıklı dekstranlar tarafından engellenir, bu da P50 sitoadherens proteininin konak hücre zarındaki sülfatidlere bağlandığını gösterir. Sülfatlanmış glikolipidler ve diğer glikokonjugatlar, erkek ve kadın ürogenital yollarında yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve *M. hominis*'in bu moleküllerle spesifik etkileşimi, *M. hominis*'in ürogenital doku tropizmini açıklamaya yardımcı olabilir. *M. hominis*'in P100 sitoadherens lipoproteini ayrıca hücre zarı boyunca peptit taşınması için bir substrat bağlama alanına sahiptir. *M. hominis* ayrıca, altı ayrı değişken adherans-ilişkili (*vaa*) gen tipi tarafından kodlanan Vaa antijen olarak adlandırılan, başka bir yüzey adhere proteine daha sahiptirler. Bu genlerin ekspresyonu açılıp kapatılabilir; bu yeteneği organizmaların hücreden hücreye yayılmasını teşvik ettiği düşünülmektedir (2,14-16).

U. urealyticum'da çeşitli virülansla ilişkili faktörler üretir. *U. urealyticum* izolatları plazma zarında lokalize olan üç fosfolipaz enzimi (A1, A2 ve C) üretirler. Bu enzimler araşidonik asidin serbest bırakılması ile fosfolipidleri hidrolize eder. *U. urealyticum* amnionitis ve perinatal morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu için (yani, spontan düşükler, prematürite, ölü doğum), patolojik olayların fosfolipaz üretimi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Amniyotik membranlardan araşidonik asitlerin serbest bırakılması, erken doğum eylemini tetikleyebilecek prostaglandinlerin üretimine neden olabilir. *U. urealyticum*'un hem insan hem de sıçan makrofaj hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin tümör nekroz faktör (TNF)- α , interleukin (IL)-6 üretimine neden olduğu ve kültürü yapılmış alveoler makrofajın nitrik oksit salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu sitokinlerin yaygın olarak salınması, çok düşük doğum ağırlıklı prematüre bebeklerde görülen inflamatuvar yanıt ve kronik akciğer hastalığının patolojisine katkıda bulunabilir. *U. urealyticum*'un insan akciğer epitel hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği gösterilmiş ve makrofajlar hücre ölümleri anti-TNF- α monoklonal antikorlar tarafından önlenmiştir. Bu veriler, bu yenidoğanlarda *U. urealyticum* akciğer enfeksiyonunun prematüre bebeklerin kronik akciğer hastalıklarında rol oynadığı bilinen inflamatuvar sitokinlerin üretilmesiyle doğrudan ve dolaylı olarak akciğer dokularının kronik bozulmasına karışabileceğini düşündürmektedir. Yukarıda açıklanan üç fosfolipaz da *U. urealyticum* ile solunum yolu enfeksiyonuna bağlı fetal akciğer

hastalığına katkıda bulunabilir. Hem *M. hominis* hem de *U. urealyticum*, mukozal IgA'nın hidrolize edilerek mukozal istilayı kolaylaştırabilen IgA proteazları üretir (2,9).

Tablo 2.2. İnsanlardan izole edilen mikoplazmalar ve ureaplazmalar (2)

Tür	Yaygın İzolasyon Bölgesi	Hastahklarla ilişkisi
<i>M. pneumoniae</i>	Solunum yolu	Pnömoni, bronşit, bronşiolit
<i>M. orale</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. salivarium</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. buccale</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. faucium</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. lipophilum</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. spermatophilum</i>	Serviks, sperm	-
<i>M. primatum</i>	Orofarinks, nazofarinks	-
<i>M. hominis</i>	Genitoüriner sistem, orofarinks	Pospartum septisemi, bakteriyel vajinozis, akciğer plevra enfeksiyonları, transplantlarda cerrahi yara enfeksiyonları, neonatal enfeksiyonlar ve amniyotis.
<i>M. genitalium</i>	Genitoüriner sistem, orofarinks	Nongonokokkal ve nonklamidyal üretritler.
<i>M. fermentas</i>	Genitoüriner sistem, solunum yolu	Human Immunodeficiency Virus (HIV)'li hastalarda.
<i>M. penetrans</i>	Genitoüriner sistem, idrar	HIV'li hastalarda.
<i>M. pirum</i>	kanda	HIV'li hastalarda.
<i>U. urealyticum</i>	Genitoüriner sistem, orofarinks, alt solunum yolu, plasental dokular	Alt solunum yolu, neonatal sepsis ve enfeksiyonlar, nongonokoksik üretrit.
<i>U. parvum</i>	Genitoüriner sistem	Genital yolu enfeksiyonları.

Mikoplazmaların konakçı hücrelere yapışması patojenite için bir ön şarttır ve bunu sağlamak için mikoplazmik membran adezin proteini veya lipoprotein bileşenleri gerekmektedir. *M. genitalium*'un 140-kDa'lık adezini en yaygın şekilde karakterize edilmiştir. Yapışma, mikoplazmanın çeşitli metabolitleri için hücre hasarına neden olan veya başka şekilde konakçı metabolizmasına müdahale etme olanağı sağlar. Buna ek olarak, mikoplazma membranlarındaki lipit modifiye proteinlerdeki antijenik

varyasyon, mikoplazmanın konakçı bağışıklık cevabından kaçmasına neden olur. Ayrıca, çeşitli mikoplazmalar, zarları veya ekstraktlarının, makrofajları ve monositleri aktive ettiği, bunun da majör proenflamatuar sitokinlerin salgılanmasına yol açtığı gösterilmiştir. Spesifik olarak, TNF- α , IL-1, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 ve interferon- γ sistemik enfeksiyonun yanı sıra lokal inflamasyon ve enfeksiyon da, anormal gebelik sonuçlarının oluşmasında önemlidir. Bunun gerçekleştiği varsayılan kaskat mekanizması, yukarıda sözü edilen sitokinlerin bir kısmını veya tamamını üretmek için fetal zarları ve desiduyu aktive eden bakteri endotoksinleri ve mikoplazma membran lipoproteinlerini içerir. Endotoksinler ve sitokinler prostaglandinlerin sentezini ve salınmasını uyarır ve proteazların ve diğer biyoaktif maddelerin üretilmesine neden olur ki bu da gebeliğin olumsuz sonuçlarına neden olabilir (2-4,9).

2.4. Yaptığı Hastalıklar

Mikoplazmalar başlıca genitoüriner sistem ve solunum yolu enfeksiyonlarından sorumludurlar. *M. pneumoniae* dışındaki mikoplazmalar çoğunlukla ürogenital kanal ya da orofarinksten izole edilirler. *M. hominis* ve *U. urealyticum* asemptomatik erkek ve kadınlardan izole edilebilir. Her iki mikroorganizma klinik olarak alt ve üst genital sistem enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur. Korioamniyonit, spontan düşükler, pelvik inflamatuvar hastalık, nongonokokkal üretrit (NGU), lohusalık ateşi, prostatit, epididimit, sistemik lupus eritematosus, piyelonefrit, infertilite, yeni doğanda pnömoni gibi yaygın dağılım gösteren hastalıklar oluşturlar (2,4,9,13).

M. hominis türleri sıklıkla ürogenital sistemi kolonize eder. Erkekler ve kadınlarda genitoüriner sistemde çeşitli enfeksiyonlarla ilişkilendirilir. Erkekler için % 10-20, kadınlarda % 20-40 arasında *M. hominis* yaygınlığı vardır. Bu patojenin artışı hem sosyoekonomik koşullar hem de cinsel aktivite önemli ölçüde etkilidir. *M. hominis* genital sistemdeki mukozal epitel iltihabıyla ilişkili genitoüriner patojenidir. *M. hominis*, sıklıkla NGU, servisit, sistit, salpingit, koryoamniyonit veya bakteriyel vajinoz olgularından izole edilmiştir. Gebelerde inflamatuvar süreçler, gebelik komplikasyonlarına yol açabilecek ve erken spontan doğuma yol açabilecek etkiler oluşturabilir. Genital sistemin *M. hominis* tarafından kolonizasyonu, ölü doğum, düşük doğum ağırlığı veya perinatal mortalite gibi komplikasyonlara neden olabilir (17,18).

Bu mikoplazmalar, birkaç açıklanamayan infertilite vakası ile ilişkilendirilmiştir. *M. hominis*'in spermden izole edilmesi ve erkeklerde düşük sperm kalitesi arasında bir ilişki olduğunu belirtilmiştir. *M. hominis*'in esasen semen konsantrasyonu ve anormal sperm morfolojisi üzerindeki olumsuz etkilerini bildiren birçok çalışma vardır. Semen parametreleri ve erkek infertilitesine olan etkisi hala belli değildir (2,19).

M. hominis'in, özellikle yenidoğanlarda, bağışıklığı baskılanmış veya predispozisyonlu bireylerde nadiren ekstragenitüriner komplikasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Santral sinir sisteminde (beyin apseleri, menenjit) veya solunum yollarındaki (pnömoni) hastalıkların nedensel ajanı olarak tanımlanmıştır (2,18,20,21).

Prostat kanseri tespit edilemeyen 27 erkeğin prostatlarında *M. hominis* saptanmamıştır. Buna ek olarak, prostat kanseri pozitif erkeklerin *M. hominis*'e karşı antikor titreleri daha yüksek olduğu ve *M. hominis* pozitif erkeklerde ortalama prostat spesifik antijen seviyelerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu veriler, mikoplazma enfeksiyonunu hücre dönüşümü, genetik istikrarsızlık ve apoptoza dirençle bağdaştırılan önceki gözlemler ile birlikte *M. hominis* enfeksiyonunun prostat kanseri gelişiminde rol oynayabileceğini ve bu nedenle potansiyel bir prostat kanseri belirleyicisinin ve / veya iyileşmeyi önleme hedefinin olabileceği bildirilmiştir (22).

M. genitalium, mikoplazma cinsinden cinsel yolla bulaşan başka bir patojendir. İlk olarak 1981'de üretritli bir erkek hastanın üretral örneğinden izole edilmiştir. Son zamanlarda servikal örneklerden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak tespit edilmiştir. Genellikle ürogenital enfeksiyonlarla ilişkilidir. Bununla birlikte, bu tür solunum yolu veya rektal örneklerde de tespit edilmiştir. Kadınlarda *M. genitalium* enfeksiyonlarının klinik bulguları üretrit veya salpingittir. *M. genitalium* sıklıkla PID'in muhtemel bir etiyolojik ajanı olarak gösterilmiş ve gebelerde spontan preterm doğumunla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu türün akut endometritise ve mukopürülan servitise neden olduğunu bildirilmiştir (2,23-26).

Erkeklerde, *M. genitalium*, NGU'in etken ajanı olarak rapor edilmiştir. NGU vakalarının yaklaşık % 10-35'inde tespit edilir ve aynı zamanda balanopostite (glans penis ve prepusiumun iltihaplanması) neden olur. Birçok çalışma, kronik ısrarcı prostatitte ve özellikle de kronik enfeksiyonlar sırasında benign insan epitel hücrelerinin habis bir transformasyonunda *M. genitalium*'un rolü olduğunu göstermiştir (2,18,26,27).

M. genitalium birçok sağlıklı yetişkinin alt ürogenital yolunda ortak olarak oldukça yaygın olan diğer genital mikoplazmaların aksine, klinik enfeksiyon yokluğunda daha az görülür. *M. genitalium*, epitel hücrelerine yapışmasını kolaylaştıran, spermilere ve eritrositlere bağlanan ve nükleer lokalizasyon bulguları ile epitel hücrelerini istila eden bir terminal yapısına (**MgPa** adezin) sahiptir. **MgPa** adezin geni ile homolog tekrarlayan DNA elementleri ailesinin, **MgPa** adezin geninin proteinindeki varyasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Suşları arasındaki dizi farklılığı ve antijenik varyasyon, konak immün tepkisini önlemeye ve yapışmayı optimize etmeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir. *M. genitalium*'un 580-kbp genomu sadece 485 protein kodlayıcı gen içerdiğinden bilinen en küçük serbest yaşayan mikroorganizma haline gelmiştir (2,28).

Bazı çalışmalar, tümör dokularının bazı mikoplazma türleriyle (çoğunlukla *M. hyorhins*) tercihli kolonizasyonunu bildirmektedir. Bu prokaryotlar aynı zamanda hücre kültürü kontaminasyonunun ortak kaynağıdır ve nükleozid katabolize enzimlerin ekspresyonundan dolayı bazı nükleozid analoglarının (NA) sitostatik aktivitesini in vitro değiştirirler (29).

Diğer patojenik bazı mikoplazma türleri immün baskılamış hastalardan veya HIV enfeksiyonlu hastalardan sıklıkla izole edilir. Birçok çalışmada, *M. penetrans* ve *M. fermentans*'ın, insanlardaki ek mikoplazma patojenik türleri olduğu ve bunun ürogenital veya solunum yollarının enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (2,4,9,18,29).

HIV ile enfekte kişilerin T lenfositleri üzerinde *M. penetrans*'ın güçlü uyarıcı etkisi, bağışıklık aktivasyonunun HIV replikasyonuna ve hastalığın ilerlemesine katkısı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte *M. penetrans* aynı zamanda primer antifosfolipid sendromu olan, HIV ile enfekte olmayan bir hastanın kanından ve boğazından izole edilmiştir. *M. fermentans*, snovial sıvı ve artrit hastalarından izole edilmiş ve bu tür hastalıkların etiyolojisinde önemli olduğu bildirilmiştir. *M. fermentans* ve *M. penetrans*'ın neden olduğu kronik enfeksiyonlar, görünüşte memeli hücrelerinin kromozomal instabilitesini ve malign transformasyonunu indükleyebileceği belirtilmiştir (2,18).

Ureaplazma erişkin kadın genital yolunda bir kommensal olduğundan düşük virülans etkili olarak düşünülmüştür. Bununla birlikte, ureaplazma ürogenital yol kolonizasyonu olarak infertiliteye, erken gebelik kaybı, ölü doğum ve preterm doğum

ile ilişkilendirilmiştir. İntrauterin enfeksiyon preterm doğumun başlıca nedeni olarak, özellikle <30 haftadan küçük gebeliklerde rol oynamaktadır. Ureaplazmalar intakt membranlar, preterm prematüre membran rüptürü (PPROM) ve amniotik boşluğun mikrobiyal istilasına bağlı kısa serviks, enfekte plasenta ve preterm doğum oluşan kadınlardan elde edilen en yaygın organizmalardır. *U. urealyticum* üreaz enzimi üretir ve kristalizasyonu arttırarak kalsiyum fosfat taslarının oluşumuna neden olur. Böbrek taşına bağlı enfeksiyonlarda ureaplazma sıklıkla izole edilir (2,9,30).

Genellikle genital mikoplazmalar *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* ve B grubu streptokoklar gibi genital sistem patojenleri ile beraber bulunmaktadır. *M. hominis* ve *U. urealyticum* bakteriyel vajinoz ile ilişkili bakterilerdir ve bakteriyel vajinozlu hastalardan izole edilebilmektedir. Bununla birlikte bakteriyel vajinozda genital mikoplazmaların rolü henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (2,9,31).

2.5. Laboratuvar Tanısı

Genital bölgede bulunan mikoplazmalar vajinal, üretral ve servikal sürüntüler, prostat sekresyonları, idrar, kan, çeşitli vücut sıvıları (solunum yolu sekresyonları, amniyotik sıvı, sinoviyal ve perikardiyal sıvı), dokular (biyopsiler, endometriyal yıkama örnekleri, plasental veya amniyotik dokular, fetal veya abortus dokuları, fallop tüpü veya uterus biyopsileri, yara biyopsileri) gibi birçok numuneden izole edilebilir (2,9,13).

Sürüntü örnekleri alüminyum veya plastik saplı dakron, kalsiyum aljinat veya polyester eküvyonlarla alınmalıdır. Tahta saplı eküvyonlar ureaplazmalar için toksik olabileceğinden dolayı kullanılmamalıdır. Sürüntü alınan eküvyonlar, mikoplazmaya özel transport besiyerine ya da rutin transport besiyerlerine konmalı, kurumasına izin verilmemelidir. Transport besiyerleri, % 10-20 fetal sığır serumu, maya ekstresi gibi mikoplazma tarafından metabolize edilen substratlar içermelidir (2,9,13).

Hücre duvarları olmadığından dolayı Gram boyama metodu ile boyanmazlar. Anilin boyalar ile zayıf boyanırlar. Bundan dolayı inceleme için çeşitli boyama yöntemleri kullanılır (karanlık alan mikroskopisi, Giemsa boyama, agar fiksasyon metodu (Dienes boyası) gibi). Agar fiksasyon yöntemiyle üreme olan besiyeri boyanmaktadır. Bakterisidal özelliğe sahip olmalarından dolayı tüm kolonilerin canlılığını kaybedeceği unutulmamalıdır (2,9,13).

2.5.1. Kùltür

Mikoplazma tespiti için en iyi testler üretral sürüntü ve sabah idrarıdır; kadınlarda vajinal ve servikal sürüntüler daha uygundur. Numuneler 24 saat içinde ve soğukta taşınmalıdır. Mikoplazmalar için, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin yanı sıra, membran sentezi için gerekli olan kolestrolün kaynağı olarak at veya fetal sığır serumu kullanılır. PH göstergesi olarak fenol kırmızısı kullanılır. Ticari agarlar da mevcuttur. Üremeleri için optimal ısı 37 °C ve % 5-10 CO₂'li ortam gerekir. Arginin veya üre ilavesi *M. hominis* ve ureaplazmanın büyümesini sağlar. Seri dilüsyonların kullanılması kantitatif analizlere izin verir. Ureaplazmalar üreyi, sarıdan pembe renge dönüştürecek şekilde, üreyi CO₂ ve amonyağa metabolize edebilen üreaz enzimi içerir. *M. hominis*, aynı renk değişikliği ile amonyağı serbest bırakan arginini metabolize eder. *U. urealyticum*'un büyümesi için pH= 6.4 ve *M. hominis* için pH= 7'dir. Ureaplazma için renk değişikliği 48 saatte belirir, ancak mikoplazmalar için bir hafta sürebilir (2,4,9,13).

Mikoplazmalar agarın yüzeyine nüfuz ederek büyürler. Kolonilerde tipik bir "sahanda yumurta" görünümü vardır (200-400 µm boyutunda); yoğun, koyu, granüle çekirdek, ince ve hafif bir bölge ile çevrelenmiştir. Ureaplazmalar 15-60 µm çapında daha küçük koloniler üretir ve bunlar tipik bir görünüme sahip değildir (2,3,9,18).

Ureaplazma türleri 1 ila 3 gün içinde bir stereomikroskop ile görülebilen koloniler üreten 10B broth ve A8 agar gibi üre içeren ortamlarda hızla büyür. A8 agarda kahverengi taneli kolonilerin görünümü ureaplazma türlerinin teşhisi için yeterlidir, ancak tek başına kültür, iki tür arasında ayırt edilemez. *M. hominis*, arjinin ile takviye edilen SP4 et suyu veya SP4 agarında iyi yetişir, ancak aynı zamanda A8 agardan ve 10B et suyunda da yetişir. Koloniler, stereomikroskop ile görülebilen, 2-3 gün içinde agarda görünür. Agar üzerinde büyüyen mikoplazmaların türünü teyit etmek için, ayırt edebilecek fenotipik testler olmadığı için, PCR testi yapılmalıdır (2,9,13,28).

2.5.2. Kùltür Dışı Tanı Yöntemleri

Genital mikoplazmalar için kültür dışı yöntemler de kullanılabilir. İndirekt Floresan Antikor (İFA) testi genital örneklerden *M. hominis*'in identifikasyonu için geliştirilmiştir. *M. hominis* için spesifik İFA prosedürleri uygulanarak *M. orale*, *M.*

salivarium, *M. fermentans* gibi diğer mikoplazma türleri ile infekte edilen Vero hücreleri boyanarak tespit edilmiştir (2,4,13,28).

PCR, nispeten kolay ve hızlı bir şekilde kültürü yapılan *M. hominis* ve ureaplazma türleri gibi organizmalar için dahi, tanısal amaçlı kültürden daha duyarlıdır. Kültür, referans metot olarak düşünülse de, PCR teorik olarak daha az organizmayı tespit edebilir; bu nedenle, PCR-pozitif, kültür negatif örnekler muhtemelen gerçek pozitifleri temsil eder. PCR, *M. hominis* ve ureaplazma türlerinin tespit edilmesi için daha duyarlı olmasına rağmen, kültür, çoğu laboratuvarlar için bu organizmaların tespit edilmesi için en düşük ve en ılımlı test hacmi için en ekonomik ve pratik yol olmaya devam etmektedir. Duyarlılık ve özgüllük, materyalin alındığı bölgeye göre değişmektedir. Nükleik asit temelli testler, normalde kolonize edilmeyen bölgelerdeki materyallerin (örneğin, eklem sıvısı veya doku, kalp kapak dokusu, beyin omurilik sıvısı) test edilmesi gerektiğinde etkenin tayininde daha iyi yardımcı olmaktadır. Teşhis amaçlı kültürel veya kültürel olmayan tespit yöntemlerinin kullanılması gerekip gerekmediği, bireysel laboratuvarlarda ve aranan türe ait kaynak ve imkânlarla bağlıdır (2,28, 32).

Kültürler birer birer ayarlanabilirken, PCR'ın en verimli ve uygun maliyetli kullanımı, birkaç numunenin toplu halde yapılmasına imkân verir. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) ile teşhis yapmak için, yeni hassas ve düşük maliyetli multipleks PCR yöntemleri daha maliyet etkin hale getirilmektedir. Bununla birlikte, toplu işlem, raporlama sonuçları için dönüş süresini uzatır. Kültür ayrıca, antimikrobik duyarlılık testinin yapılabileceği bir izolat sağlaması açısından ek avantajlara sahiptir. Yüksek hassasiyette PCR testleri, dönüş süresi çok kritik olmadığında ve numunelerin maliyet etkinliği için toplu olarak test edilebildiği araştırma çalışmalarında yararlıdır. Kültürde *M. genitalium* bulma yeteneğini arttırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olmakla birlikte, yüksek başarısızlık oranı ve son derece yavaş büyüme, kültürü pratik yapmaz ve moleküler tabanlı testler kullanılır (2,28, 32).

M. hominis için konvansiyonel PCR testlerinde esas olarak bir gen hedefi olarak 16S rRNA kullanılmıştır. Ancak *M. hominis*'in 16S rRNA geninde bazı heterojenlik bildirildiğinden *gap*, *fstY* ve *gidC* gibi ek hedef genleri geliştirilmiştir. *M. hominis*, kadın serviks ve vajinada ve erkek üretrada yaygın bir komenmensaldir. Dolayısıyla, bu organizmalarla ilişkili olduğu bilinen klinik belirtilerin yokluğunda, bu bölgelerden alınan örneklerde PCR sonucu pozitif çıkmayabilir. Bununla beraber, *M. hominis* yükü

$\geq 10^4$ CFU / mL'ye ulaşırsa, bu kadınlardaki ürogenital enfeksiyonlar için kritik bir kriter olabilir. Yetişkinlerde veya yenidoğanlarda ekstragenital örneklerde pozitif *M. hominis* PCR testi veya kültür sonucu klinik olarak anlamlı kabul edilmelidir (28).

M. pneumoniae ve *M. genitalium* yapısal ve antijenik olarak ilişkili olsalar da, genomik olarak farklıdır. Erken PCR deneylerinin çoğu, **MgPa** operonunun çeşitli bölgelerini hedef almış, ancak bazıları 16S rRNA genini kullanmıştır. Transkripsiyon aracılı amplifikasyon da dahil olmak üzere ek moleküler tabanlı tahliller epidemiyolojik amaçlar için de kullanılmıştır. Kantitatif, hızlı gerçek zamanlı PCR testlerinde, **MgPa** operonu, 16S rRNA, 115-kDa geni ve gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz kodlayan gen hedefleri kullanılmıştır. Bu veriler, konakçı savunmalarının kaçınılmasını kolaylaştıracak çeşitli varyantların üretilmesine olanak tanıyan etkili bir rekombinasyon sisteminin olduğunu ve teşhis testleri için en uygun PCR primerlerinin belirlenmesi ve doğrulanması için ilave araştırma ve geliştirme geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. *M. genitalium*'da fluorokinolon direncine aracılık eden DNA girazı ve / veya topoizomeraz IV'deki mutasyonları tespit etmek için PCR tabanlı tahliller de geliştirilmiştir ve böylece bu mikroorganizmalara antimikrobiyal duyarlılıkları belirlemek için in vitro kültür gereksinimini ortadan kaldırmıştır (2,28).

Ureaplazma türünün tespit edilmesi ve tanımlanması için jel bazlı konvansiyonel PCR testleri, 16S rRNA ve 16S -23S rRNA intergenik bölgeleri, üreaz genini ve **mba**'yı hedef almışken, gerçek zamanlı PCR deneyleri esas olarak üreaz genlerini ve onların alt ünitelerini veya **mba**'yı hedef almıştır. Ureaplazmaların tespit edilmesi için PCR analizi, üreazı veya 16S-rDNA'yı tespit edebilir ve *U. urealyticum* ile *U. parvum* (eski adıyla *U. urealyticum*, biovar 2) arasında ayrım yapabilir (2,4,28).

Mikoplazma antikorlarının tespit edilmesi, önceden kolonizasyon ve çapraz reaksiyon olasılığı nedeniyle özgüllük göz önüne alındığında serolojik testler yeterli değildir. Artan titre seviyeleri, akut enfeksiyon belirtileri olabilir. Antikorlar için çeşitli ticari testler mevcuttur (hemaglutinasyon, immünofloresan). Farklı mikoplazma suşları, örneğin klonlanmış **MgPa** adezin genleri (*M. genitalium*) ile Western blot analizi ile ayırt edilebilir (2,4,9,13,28).

2.6. Gebelikte Tedavi

Gebelik sırasında, kontrendike olmamakla birlikte ürogenital mikoplazmalara karşı etkili antibiyotiklerin sayısı azalmaktadır. Makrolidler ve klindamisin kullanılması izin verilir. Gebelerin tedavisinde en sık kullanılan antibakteriyel olan eritromisin sadece orta derecede bir aktivite göstermektedir. Hem ureaplazma hem de *M. hominis*'e karşı tutarlı etkinlik gösteren tek makrolid josamisin ve gebelik sırasında kullanılması izin verilmektedir. Josamisin molekülünün farklı konfigürasyonu, bakterilerin sahip olabileceği önemli bir direnç mekanizması olan efflux pompasına dirençli olmasını sağlar. *M. genitalium* enfeksiyonları azitromisin ve josamisin ile tedavi edilebilir, ancak direnç bir sorun teşkil edebilir (2,28,32).

Amniyosentezle alınan amniyotik sıvıda genital mikoplazmaların herhangi birinin bulunması durumunda, tedavi olarak florokinolonlar ve / veya klindamisin önerilmiştir. Tetrasiklinler, *M. hominis*'in birçok suşuna karşı etkilidir, ancak bazıları tetrasikline direnç gösterir. Gebelikte bu antibiyotiklerin verilmemesine bağlı olarak, klindamisin kabul edilebilir alternatif bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Bununla birlikte, 22 haftalık gebelik öncesi klindamisin, anormal vajinal floraya sahip kadınlara verildiğinde erken doğum ve düşük doğum ağırlığı oranında belirgin bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur. Ureaplazmalar için eritromisin tedavi başarısızlığı, erken doğum etyolojisinde eritromisin potansiyel etkinliği de düşürmektedir. Ureaplazmaların en az %10'u tetrasiklinlere dirençlidir ve bu suşların büyük bir kısmı, *M. hominis*'in dirençli olduğu eritromisine çapraz direnç gösterir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından önerilen bir PID tedavi rejimi olan sefoksitin ve doksisisiklinin bir kombinasyonu, *M. genitalium* tarafından üst genital bölge enfeksiyonunun tedavisinde etkisizdir. Azitromisin, *M. hominis* hariç *M. genitalium*'a ve diğer mikoplazmalara karşı daha aktiftir. Ureaplazmalar zayıf etkilenir ve *M. genitalium*'dan daha az duyarlıdır. Eritromisin, roksitromisin ve azitromisinin transplasental geçişi kötüdür, ancak *M. hominis*'in hassas olmadığı klaritromisin geçişi, *M. genitalium* ve ureaplazmalara etkisi diğer makrolid antibiyotiklerinkinden daha fazladır (3,32-34).

M. hominis ve/veya ureaplazmaya bağlı doğum sonrası ya da postabortal ateş genellikle tedavi yapılmaması sonucu yerleşir. Ateş şiddetli veya sürekli ise, antibiyotiklerin uygulanması gereklidir. *M. hominis*'e karşı da aktif olan klindamisin ve ureaplazma için oldukça aktif olan klaritromisin gibi, bakteriyel vajinoziste bulunan

bakterilere karşı aktif olan geniş spektrumlu antibiyotikleri kullanarak, kan kültürlerinin sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. Yenidoğan için gebelikte profilaktik antibiyotikler daha önce verilmezse, kan kültürlerinin sonuçlarına göre yukarıda belirtilen antibiyotiklerle solunum yolu hastalığı veya menenjit tedavisi gerekebilir (3,35).

2.7. Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri

Mikoplazmalar için çeşitli antibiyogram testleri mevcuttur. Agar disk difüzyonu, mikoplazmaların in vitro duyarlılık testi için kabul edilebilir bir yöntem değildir. Mikoplazmaların antimikrobiyal duyarlılık testleri için hem agar dilusyonu hem de broth dilüsyon yöntemlerinin yanısıra E-test yöntemleri de tanımlanmıştır. Bununla birlikte, hassasiyet testleri için tek biçimli standartlar bulunmamaktadır. Mikoplazmaların duyarlılık testi için kullanılabilen çeşitli ticari ürünler de vardır. Bütün bu duyarlılık prosedürlerinde, organizmaların biyolojik özelliklerine ve yöntemle ilişkin çeşitli problemler ile karşılaşılabilir (2,4,9,13).

2.8. Epidemiyoloji

Ureaplasma ve *M. hominis* fırsatçı patojenler olarak kabul edilir, çünkü sağlıklı kadınların alt ürogenital yollarından ve hastalıklı bireylerden izole edilebilirler (2,9,28,).

M. hominis ve / veya ureaplasma ile enfekte uterus enfeksiyonu, sağlam membranlara göre daha yaygındır. Bebeğin kolonizasyonu genellikle doğumda, enfekte serviks / vajina ile temastan kaynaklanır ve bu nedenle sezaryenle doğan bebekler daha az kolonize olmaktadır. Yenidoğan kolonizasyonun sıklığı, belirli bir popülasyonda vajinal kolonizasyona göre değişir. Anneden bebeğe dikey olarak *M. genitalium* iletimi nadirdir, bu mikoplazmanın endometrium, serviks ve vajinada tespit edilmesine rağmen sadece bir vakada bildirilmiştir. *M. hominis* ve ureaplasma ile yenidoğan kolonizasyonu yenidoğan döneminin ötesinde ısrarcı olmamakla birlikte ureaplasma ve *M. hominis* prepubertal kızların beşte birinde ve altıda birinde bulunmuştur. Ergenlik ve cinsel aktiviteden sonra, *M. hominis* ile kolonizasyon ve daha çok ureaplasma görülür ve farklı cinsel partnerlerin sayısına göre artar. Cinsel ilişki dışında, bir popülasyondaki genital mikoplazmaların prevalansı yaş, ırk, sosyo-ekonomik durum, kontrasepsiyon, menstruasyon, menopozal değişiklikler ve gebelikten etkilenmektedir. Gebelikte immünolojik ve hormonal değişiklikler kolonizasyonu etkileme eğilimindedir. Östrojen

ve progesteronun, *M. hominis*, ureaplazma ve *M. genitalium* dahil olmak üzere, farklı mikoplazmalarla dişi farelerin genital yolunun kolonizasyonuna güçlü bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Buna göre, genital mikoplazmaların, gebe ve gebe olmayan kadınlarda kesin prevalansının belirlenmesinde, yukarıda listelenen tüm faktörlerin göz önüne alınması gerekmektedir (3,4,9,28,32).

2.9. Mikoplazma Enfeksiyonlarının Önlenmesi ve Aşılar

M. pneumoniae enfeksiyonlarını önlemek için inaktif aşı çalışmaları girişimleri olmuştur. *M. pneumoniae* enfeksiyonlarını yaklaşık % 40 oranında azalttığı ve bu çalışmaların geliştirilmesi ile yüksek riskli grupların aşılanaileceği bildirilmiştir. Bir P1-C DNA aşısı *Escherichia coli*'nin ısı-labil enterotoksininin B-subüniti ile birleştirilerek oluşturulmuş ve farelerdeki *M. pneumoniae* enfeksiyonlarında yüksek etkinlikte koruyucu bulunmuştur. Aşı geliştirilmesi için *M. pneumoniae*'nin fonksiyonel adezin bölgelerinden türetilmiş kimerik proteinlerin serolojik olarak oluşturulmasına yönelik stratejiler hayvan modellerinde de etkinlik göstermiştir (2).

2.10. Chlamydia trachomatis

C. trachomatis karakteristik bifazik gelişim döngüsü olan nonmotile, zorunlu hücre içi bir bakteridir. Elementer cisim, hücre dışı, enfeksiyöz, metabolik olarak aktif olmayan formdadır. Konak içine alınmasını takiben, temel organlar vakuolar inklüzyonlarda kalırlar ve burada retiküllü cisim olarak adlandırılan hücre içi forma dönüşürler. Retiküllü cisimler bulaşıcı değildir, metabolik olarak aktiftir ve ikiye bölünerek çoğalırlar. Retiküllü cisimler, egzozitoz veya konakçı hücre lizisi ile salınan temel cisimlere geri döner (2,9,13).

Şu anda cinsel yolla bulaşan en yaygın patojenlerden biri olarak tanınmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 verilerinde, her gün 1 milyondan fazla kişinin CYBH kazandığını bildirmiştir. Her yıl yaklaşık klamidy (131 milyon), gonore (78 milyon), sifiliz (5.6 milyon) ve trikomonaz (143 milyon) olmak üzere 4 CYBH'den 1'i ile olmakla beraber 357 milyon yeni kişi enfeksiyon kazanmaktadır. Ülkemizde de 2005 yılından itibaren *C. trachomatis*, CYBH etkeni olarak grup D bildirimi zorunlu hastalıklar kapsamına alınmıştır (7,36).

C. trachomatis majör dış membran proteininin (MOMP) antijenik farklılıklarına göre 18 serovara ayrılmaktadır. *C. trachomatis* serovar A, B, Ba ve C trahom

hastalığına neden olur. *C. trachomatis* serovar D-K, genital sistem ile ilişkili enfeksiyonlara neden olur ve özellikle gelişmiş ülkelerde en sık görülen bakteriyel CYBH etkenidir. Tipik olarak erkeklerde NGU ve kadınlarda serviste neden olurlar. Hastalık genelde klinik belirti vermeden seyrederek. Üretra ve alt genital sistem enfeksiyonu olarak; dizüri, beyazımsı/renksiz/mukopürülan vajinal akıntı ve ilişki sonrasında kanamaya neden olabilir. Üretrit ve daha seyrek olarak proktit ile konjonktivit, kadın ve erkek hastalarda ortak görülebilen klinik belirtilerdir. *C. trachomatis*'in neden olduğu CYBH genellikle belirtisiz seyrettikleri için tespit edilememekte ve bu nedenle tedavi edilememektedirler. Tedavi edilmeyen olgularda üst bölgeye yayılım ile erkeklerde epididimit ve kadınlarda endometrit, salpenjit ve PID gelişebilir. Kadın hastalarda üst genital sistem enfeksiyonu olarak; düzensiz kanama, pelvik rahatsızlık hissi ve kronik karın ağrısına neden olabilir. PIH'e bağlı yapışıklıklar sonucunda infertilite ve ektopik gebelik gelişebilmektedir. *C. trachomatis*, enfeksiyona bağlı infertilitenin en fazla görülen nedenidir (2,9,13,37,38).

C. trachomatis serovar L1, L2 ve L3, lenfgranuloma venereumun (LGV) etkenidir. LGV'de primer lezyon bulaş bölgesindeki küçük, ülser olmaya meyilli ağrısız papüldür ve genellikle dikkatten kaçır. LGV'nin en sık görülen klinik tablosu; tipik olarak tek taraflı, hassas inguinal ve/veya femoral lenfadenopatidir. Lenf bezleri birleşerek fluktuasyon veren kitleye dönüşebilir, komşu bölgelere drene olabilir. Tedavi edilmeyen olgularda fibrozise bağlı yapışıklık ve lenfatik kanallarda tıkanıklık gelişebilir (2,9,13,38).

Kadınlarda genital sistem enfeksiyonlarının hedef hücreleri, endoserviks ve üst genital sistemin squamo-kolumnar epitel hücreleridir. Üreme sistemi epitelinin enfeksiyonu, IL-1, TNF, IL-8, büyüme ile ilişkili onkojen (GRO)-a, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IL-6, bağışıklık hücrelerinin çekilmesine yardımcı olan endotelial yapışma moleküllerinin artmış ekspresyonunu indüklemektedir. Yerleşik doku makrofajları, sitokinlerin ve kemokinlerin erken bırakılmasına da katkıda bulunur. Enfekte epitel hücreleri, doku proteolizisine ve yeniden biçimlenmesine katkıda bulunan matris metaloproteazları (MMP) serbest bırakır. Yeniden enfeksiyon sırasında, konakçı hücrelerin kemokinleri salması, yanıtı hızla artıran klamidyaya özgü immün hücrelerin toplanmasına neden olur. Klamidyanın neden olduğu endometrit ve salpingit, ısı şoku proteinlerine (hsps), özellikle hsp 60 antikorlarına neden olur. Retiküllü

cisimler bağışıklık sisteminden kaçabilir ve sürekli enfeksiyona neden olabilir. Retiküllü cisimciklerden yeni temel cisimlerin oluşması, bağışıklık tepkisini ve enflamatuvar reaksiyonları indükleyebilir, enfekte dokuya skarlaşan siklik bir süreçle sonuçlanır ve fallop tüplerinin kısmen veya tamamen obliterasyonu ile sonuçlanarak tubal faktör infertilitesi veya alt infertiliteye yol açar (39,40).

Klamidyanın neden olduğu PID, tubal faktör infertilitesinin ve olumsuz gebelik sonuçlarının önlenabilir en yaygın nedenlerinden biridir. Gelişmekte olan ülkelerde genital *C. trachomatis* enfeksiyonu ve sekeli prevelansı ile ilgili kesin veri güvenilir değildir çünkü rutin tarama yöntemleri olarak pahalı ve karmaşıktır. Hamilelikte *C. trachomatis* gibi CYBH'nin taranması ve tedavisinin oluşturulması küresel bir öncelik olması gerektiği bildirilmiştir (41,42).

İnsan epiteli konakçı hücrelerinde dinlenme ve bulaşıcı formlarda bulunma yeteneği bulunan hücre içi bakteriler olarak *C. trachomatis*, eradikasyona karşı eşsiz bir yeteneğe sahiptir. Konağın tespiti ve yok etmesinden kaçabilen bu yeteneği, kadınlar arasında olumsuz sonuçlara yol açmasına katkıda bulunur. Kadınlarda sıklıkla asemptomatik bir enfeksiyondur. *C. trachomatis* rahim ağzı, fallop tüpleri veya komşu pelvik yapıların artan bir enfeksiyonu olan servisit, üretrit ve PID veya asemptomatik olarak endometritis, salpenjit, tuboovarian apse, pelvik peritonit, perihepatit veya periappendisit yapabilir. Buna ek olarak, *C. trachomatis* ile enfeksiyon, gebe kadınlar için özel riskler oluşturabilir. *C. trachomatis* ve diğer üreme sistemi enfeksiyonları, olumsuz gebelik sonuçları için risk faktörleri olarak uzun süredir bildirilmektedir. *C. trachomatis*'in dışındaki diğer klamidya türlerinin (*C. pneumoniae* ve *C. abortus*) ve klamidya benzeri ortaya çıkan organizmalarında (*Waddlia* ve *Parachlamydia*) özellikle düşük, ölü doğum gibi olumsuz gebelik sonuçları ile bağlantılı olması daha fazla destek kazanmaktadır (42,43).

Hem epidemiyolojik hem de deneysel araştırmalarda, hamilelikte klamidyanın doğrudan fetal enfeksiyon, plasental hasar ya da şiddetli maternal hastalık oluşturarak düşük, ölü doğum, ya da preterm doğum gibi olumsuz etkiler için bir risk oluşturduğunu ileri sürülmüştür. Klamidyal enfeksiyonun gebelikte istenmeyen sonuçları nasıl doğurabileceğinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. *C. trachomatis*'in, fetusa bulaşabileceği, muhtemelen insan 60kDa ısı şok proteinleri ile klamidyal homolojisinden dolayı embriyonik reddine neden olan maternal bir inflamatuvar yanıt

neden olabileceği ve sitokin salınımıyla zararlı bir enflamatuvar cevabı tetikleyerek düşük, erken membran rüptürü veya preterm doğum ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir. Klamidyal ısı şok proteinine (CHSP-60) karşı oluşan bu enflamatuvar yanıtların tubal infertiliteye ve ektopik gebeliğe yol açabilecek tubal hasardan da sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar genel olarak enfeksiyonların geç düşüklerin % 10-66 kadarını oluşturabileceğini ve düşük ve orta gelirli ülkelerdeki gebe kadınlarda düşük için bir risk faktörü olabileceğini öne sürmüşlerdir. *C. trachomatis* gibi genital sistem enfeksiyonları, düşüklerin potansiyel bir tetikleyicisi olarak gösterilmiştir (40,42-44).

2.10.1. Laboratuvar Tanısı ve Tedavisi

Seroloji testlerinin komplike olmayan genital *C. trachomatis* enfeksiyonu testinde çok az bir tanı değeri vardır. Geçirilmiş klamidy enfeksiyonunun, sistemik bir antikor tepkisini uyaramayabileceği veya bulamayabileceği için, tarama için kullanılmamalıdır. *C. trachomatis*'in LGV serovarlarının neden olduğu enfeksiyonlar, tespit edilebilir lenf nodlarına girme eğilimi gösterir ve bu da tespit edilebilir sistemik antikor yanıtının olasılığını artırır ve kasık (rektal değil) hastalığın teşhisine yardımcı olabilir. Kompleman fiksasyon testi klasik olarak bu amaçla kullanılmış, ancak yerini duyarlı türe özgü mikro-immünofloresan testi almıştır (38,45).

C. trachomatis izolasyonu için doku kültürü yöntemleri standartlaştırmak, teknik olarak pahalıdır ve nispeten duyarlı değildir. Bu nedenle, tanı testi üreticileri, kültür dışı testler geliştirmiştir. *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae*'nin ilk kültür dışı testleri, spesifik olarak klamidyal veya gonokok antijenlerini tespit eden enzim immünoassay (EIA)'leri ve *C. trachomatis* için direkt floresan antikor (DFA) testlerini içermektedir. Bu testler, smearlerdeki bakteri antijenine spesifik olarak bağlanan floresein konjuge monoklonal antikorları kullanmaktadır. Bu antijen arama testlerini, *C. trachomatis* spesifik DNA veya RNA dizilerini tespit eden nükleik asit hibridizasyon testleri izlemiştir (45,46).

Mevcut kültür dışı testlerden rutin kullanım için sadece NAAT önerilirken, diğer testler (örneğin, EIA'ları, nükleik asit testleri ve genetik transformasyon testleri) önerilmemektedir. Enfeksiyona karşı sistemik bir bağışıklık cevabı tespit eden serolojik

testler, aktif bir enfeksiyonun tespit edilmesi için yeterli hassasiyeti bulunmaması nedeniyle önerilmemektedir (36,47).

NAAT, *C. trachomatis* genital enfeksiyonlarının tanısında vulvovajinal sürüntüler ve ilk akım idrar da dahil olmak üzere çeşitli örnek tipleri için yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve uygunluğu nedeniyle tercih edilen testlerdir. NAAT ayrıca, kadın hastalarda asemptomatik *C. trachomatis* enfeksiyonunun tespiti için daha az invaziv prosedürlerin kullanılmasını kolaylaştırmıştır. Çeşitli ticari NAAT'ler mevcuttur ve farklı teknolojilerden faydalanırlar; klasik ve kantitatif PCR, iplikçik yer değiştirme amplifikasyonu (SDA), transkripsiyon aracılıklı amplifikasyon (TMA) ve nükleik asit dizilisine dayalı çoğaltma (NASBA). Bu kitlerin yüksek maliyeti ve uygun altyapı eksikliği, gelişmekte olan ülkelerde büyük tarama programları için bu kitleri kullanmayı engellemektedir (46-50).

Gebeler için ilk seçilecek antibiyotik eritromisindir. LGV'da sulfonamidler in vitro etkili olmalarına rağmen klinik olarak kullanılmazlar. Tetrasiklin, eritromisin ve rifampisin LGV'un her evresinde etkilidir. Genital enfeksiyonlarda eşlerin beraber tedavi edilmesi gerekir. Aminoglikozidlerin klamidyalara inhibitör etkisi yoktur. Klamidyalarda bazı enfeksiyonlarında gümüş nitrat, borik asit ve lügol gibi antiseptikler; aldehit ve klor gibi dezenfektanlar lokal olarak uygulanmaktadır. Gebelik sırasında klamidy enfeksiyonunun tanı ve tedavisi, bu enfeksiyonla ilişkili perinatal morbidite ve mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (48,49,51).

2.11. *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae, Neisseriaceae familyası içinde yer almaktadır. Aerobik olarak ürerler. Katalaz ve oksidaz reaksiyonları pozitif olup indol negatiftirler. Nitratları nitrite dönüştüremezler. DNA'daki G+C oranı % 48-50 mol'dur. Gram negatif koklar olup, tipik olarak ikili dururlar, düz veya bir yüzeyleri hafif iç bükeydir. Konkav olan bu yüzeyleriyle karşılıklı dururlar (2,9,13).

Gonoreni (bel soğukluğu) etkeni olan *N. gonorrhoeae* CYBH'nin en yaygın ikinci bakterisidir ve dünya çapında ciddi morbidite ve ekonomik maliyetlerle sonuçlanmaktadır. *N. gonorrhoeae* ile yaklaşık olarak 78 milyon yeni enfeksiyon her yıl dünya çapında görülmektedir. Zorunlu bir insan patojeni olan *N. gonorrhoeae*, üretra, endoserviks, farinks veya rektumun mukoza zarlarını enfekte eder. Komplikasyonsuz

gonokok enfeksiyonu genellikle erkeklerde üretrit olarak kendini gösterir ve kadınlarda mukopürülan servisitise neden olabilir. Hem kadınlarda hem erkeklerde rektal ve farengeal enfeksiyonlar asemptomatiktir. Gonokoksik enfeksiyonlar genellikle kadınlarda asemptomatiktir; belirgin semptomların olmaması, PID, kronik pelvik ağrı, maternal bulaşma, ektopik gebelik ve infertilite gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilecek, tanınmayan ve tedavi edilmemiş enfeksiyon ile sonuçlanır. Erkeklerde tedavi edilmeyen üretral enfeksiyon, prostatit, epididimit, üretral darlık ve infertiliteye neden olabilir. Gonokok enfeksiyonu olan annelerin bebekleri, tedavi edilmediği takdirde körlüğe neden olabilecek neonatal konjunktivit ile sonuçlanabilir. Bazen, bazı kişiler sistemik komplikasyonları olan yaygın enfeksiyonlar geliştirebilirken, bazıları asemptomatik enfeksiyonlara sahip olabilirler ve bilinçsizce gonokokları nakledebilirler. Orofarengeal ve anorektal gonokok enfeksiyonları, alıcı oral veya anal ilişkide bulunan kişiler tarafından veya servikal sekresyonlardan kontaminasyon yoluyla edinilebilir. Bazen yetişkinler konjunktivit ile birlikte olabilir. Gonore ülkemizde rutin izlenen, bildirimi zorunlu bir hastalıktır (2,7,9,13,45,52).

2.11.1. Laboratuvar Tanısı ve Tedavisi

Örnekler Dacron veya rayonlu çubuklarla toplanmalıdır, çünkü kalsiyum alginat gonokoklara toksik olabilir. Yağ asitleri gonokokların büyümesini engeller; bu nedenle, pamuklu çubuklar kullanılmamalıdır. Örnekte bilinmeyen maddelerin önleyici etkilerini en aza indirmek için, örnekleri aldıktan hemen sonra, sürüntüler büyütme ortamına doğrudan inoküle edilmeli veya taşıma ortamına konulmalıdır. İdrar, erkeklerde ve bayanlarda *N. gonorrhoeae* enfeksiyonlarının teşhisi ve nükleik asit testleri için uygun örnek türlerinden biridir. Hastalara idrar numunelerinin toplanması için sızdırmaz kaplar sağlanmalıdır (2,9,13,45,53).

N. gonorrhoeae'nin ön teşhisi, seçici ortamda yetişen ürogenital bölgede bulunan bir oksidaz-pozitif, Gram-negatif diplokok izolasyonuna dayanmaktadır. Üretra sızıntılarının veya endoservikal sekresyonlardan bir smearın Gram boyasında tipik Gram-negatif intrasellüler diplokoklar görülür. Oksidaz testinde, oksidaz reaktifinin tetrametil türevini kullanır (2,9,13,45,53).

Birincil örnekler, kommensal bakteri ve mantarların büyümesini engelleyen seçici antimikrobiyal içeren seçici olan ve seçici olmayan agarın üzerine inoküle edilmelidir.

Modifiye Thayer-Martin, Martin Lewis ve New York City'deki antibakteriyel ajanlar; vankomisin, kolistin, trimetoprim laktat ve antifungal ajanlar; nistatin ve anizomisin veya amfoterisin B'dir. Arginin, hipoksantin ve urasil isteyen suşlar gibi bazı titiz suşlar, seçici ortamda kullanılan vankomisin veya trimetoprim konsantrasyonlarına daha duyarlıdır. İnoküle edilen petri CO₂ ile zenginleştirilmiş (% 3 ile % 7) nemli bir atmosferde 35 °C ile 37 °C'de inkübe edilmelidir. Ek testler için 18 saat ile 24 saat arasındaki kültürler kullanılmalıdır. Petri, eski kültürlerin saklama koşullarında canlı kalamayacağı için 48 saatten uzun süre inkübe edilmemelidir (2,9,13,45,53).

Moleküler tespit yöntemleri, titiz çalışma gerektiren ya da kültürü zor yapılan patojenlere karşı, daha hızlı ve spesifik bir teşhis koymayı sağlar. Cinsel yolla bulaşan patojenler için geliştirilen nükleik asit yöntemleri, hızlı, çok duyarlıdır ve klinik örneklerde bu organizmaların tespit etmek için spesifiktir. Bu yöntemler, rahatsızlık vermeden hastalardan elde edilebilen, idrar ve vajinal sürüntüler gibi, kültür için uygun olmayan örneklerin kullanılmasına izin verir. *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* için tek veya ikili analiz testleri piyasada mevcuttur. Nükleik asit metotları, uzun taşıma süresi veya aşırı sıcaklık koşullarına maruz kalma nedeniyle canlı organizmalar içermeyebilecek numunelerde *N. gonorrhoeae*'nin tespiti için uygundur. DNA amplifikasyon testleri, tedavi testi için uygun olmayabilir, çünkü gonokokal DNA, başarılı bir enfeksiyon tedavisinden sonra haftalarca bulunabilir (2,9,13,45,53,54).

PCR tabanlı tespit yöntemleri için spesifik primerler literatürde de tarif edilmiştir. Bu yöntemler duyarlıdır, ancak özgüllük primerlerin seçimine bağlıdır. Bazı örnekler PCR için inhibitör madde içerebilir. Bunu önlemek için; numune için bir DNA saflaştırma prosedürünün kullanılması (bazı saflaştırma kitleri ticari olarak temin edilebilir), idrar numunelerinin seyreltilmesi veya başka bir idrar örneği kullanarak amplifikasyon tekrarlanabilir. Ticari kitler mevcuttur, ancak doğrulama testleri olarak kullanıldığında daha pahalıdır (2,9,13,45,53,54).

Hasta serumlarındaki *N. gonorrhoeae*'ye özgü antikorlar veya antijenler gösterilmesine rağmen, yakın zamanda geçirilmiş gonokok enfeksiyonlarını tespit etmek için spesifik ve duyarlı bir serolojik test bulunmamaktadır (2, 45,53).

Antibiyotik duyarlılık testleri; kültürler mevcut olduğunda laboratuvarı *N. gonorrhoea* karşı duyarlılık testleri yapılmalı veya bu testlerin yapıldığı bir referans laboratuvara gönderilmelidir. Bu sonuçlar, tedavi başarısızlığını araştırmak ve halen

önerilen terapilerin etkinliğini izlemek için yararlıdır. Bel soğukluğunu tedavi etmek için önerilen antibiyotikler, siprofloksasin, spektinomisin ve seftriakson ve sefiksim gibi üçüncü kuşak sefalosporinlerdir. Penisilin ve tetrasiklin antibiyotiklere karşı direnç izlenmelidir, çünkü bunlar hala dünyanın diğer bölgelerinde kullanılmaktadır ve bu iki antibiyotiğe karşı direncin dünya çapında yaygınlığı yüksek kalmaktadır. Halen *C. trachomatis* koenfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan doksisisiklin ve azitromisin veya eritromisin, *N. gonorrhoea* selektif baskı uygulayarak dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olabilir. Azitromisin, gonoreyi tedavi etmek için bazı ülkelerde kullanılmaktadır ve dirençli suşlar literatürde tanımlanmıştır (2,53-55).

Komplike olmayan genital (serviks, üretra) ve anorektal gonokoksik enfeksiyonlu gebe kadınlarda tek tedaviye kıyasla ikili tedavinin faydalı ve zararlarının düşük olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır, ancak birçok bölgede tek tedavilere (sefiksim, seftriakson ve azitromisin) direnç ve yerel çalışma verileri bulunmaması nedeniyle çift terapi (sefiksim+azitromisin veya seftriakson+azitromisin) tercih edilmektedir. Çift terapi şu anda bazı durumlarda kullanılmaktadır ve kabul edilebilir görünmektedir. Etkinlikle karşılaştırıldığında çift terapilerin maliyetleri tekli tedaviden daha büyük değildir (54).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'ne, Mart 2016 ve Kasım 2016 tarihleri arasındaki 9 aylık periyotta, amniyotik sıvı gelmesi, endoservikal akıntı-kanama, ağrı-sancı, yanma gibi şikayetlerle başvuran ve erken membran rüptürü şüphesi bulunan 18-43 yaşları arasındaki ≤ 34 hafta gebeliği olan 61 hamile kadından servikal, vajinal sürüntü ve idrar numuneleri ile kontrol grubu olarak 19-39 yaşları arasındaki ≤ 34 hafta gebeliği olan 21 sağlıklı gebeden vajinal sürüntü ve idrar numuneleri alındı. Servikal ve vajinal örneklerden selektif besiyerlerinde mikoplazmaların ve ureaplazmaların kültürleri yapıldı. Direkt örneklerden ve kültürde üretilen suşlardan DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR çalışması yapıldı. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi ile DNA'ları *VspI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek mikoplazma suşlarının doğrulaması yapıldı. *M. hominis* suşlarında, erken membran rüptüründen sorumlu tutulan *arl*, *goiB* ve *goiC* hedef bölgeleri araştırıldı. Servikal, vajinal ve idrar örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR ile *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* araştırıldı.

3.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Reagenler

3.1.1. Sodyum Fosfat Solüsyonu (PBS)

0.1 M-NaCl: 5,844 gr (Merck, Lot: K20084200)

2.5 mM-KCl: 0,445 gr (Merck, Lot: 2538810)

10 mM-Na₂HPO₄: 1,411 gr (Merck, Lot:F1485086 722)

1.5 mM-KH₂PO₄: 0,204 gr (Merck, Lot: A0383573 230)

(pH: 7,4) Ultra pure su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.2. 10x Tris-EDTA (TE) Solüsyonu

Tris-HCl: 1,576gr (Merck, Lot: K35871214 613)

EDTA: 0,372gr (Sigma, Lot: 67H1534)

(Ph: 7,6) Ultra pure su ile 100 ml 'ye tamamlandı.

3.1.3. 10x Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Solüsyonu

Tris-base: 108gr (Sigma, Lot: SLBL6398V)

Borik Asit: 55gr (Sigma, Lot: BCBM2648V)
EDTA: 7,44gr (Sigma, Lot: 67H1534)
(pH 8,4) Ultra pure su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.4. Master Mix Karışımı

PCR Master Mix (Thermo Scientific K0172, Lot: 00290918)

İçindekiler:

Taq DNA polimeraz (0,05 U/ µl)

Reaksiyon buffer

MgCl₂ (4 mM)

dATP (0,4 mM)

dCTP (0,4 mM)

dGTP (0,4 mM)

dTTP (0,4 mM)'den oluşan (20X1,25mL) ve (20X1,25mL) nükleaz free su,
-20 °C' de saklandı.

3.1.5. Etidyum Bromid

Etidyum bromid: 0,5 g (Amresco, Lot:1252B33)

Distile su: 100 ml ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı ve +4°C' de saklandı.

3.1.6. DNA Marker

Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific SM0321, Lot: 00329169)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific SM0371, Lot: 00391647)

3.2. Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

3.2.1. İdrar Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

İdrar örneklerinden DNA ekstraksiyonu için cam boncuklarla (glass bead, Sigma) mekanik lizis prensibine dayalı çalışan Mickle Ekstraksiyon (The Mickle Lab. Engeneering Co. Ltda, Gomshall, Surrey, UK) cihazı kullanılmıştır. İdrar örnekleri 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve aşağıdaki basamaklar izlenerek ekstraksiyon yöntemi tamamlandı;

1-Santrifüj tüplerinde bulunan idrar örnekleri 3.000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi,

2-Süpernatant pipet yardımı ile dikkatle alınarak uzaklaştırıldı ve altta kalan pellete yakın kısımdan pipetle 500 µL alınıp materyalin numarası yazılı ependorf tüplerine aktarıldı.

3- Pellet üzerine, 500µL 1x TE(10mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5) tamponu eklendi.

4- Daha sonra, ependorf tüpleri 100 °C'de 10 dakika ısı bloğunda tutuldu.

5- İçinde 500µL bakteri süspansiyonu olan bu ependorflara, yaklaşık 150µL boncuk (Sigma) konuldu.

6- Süspansiyonlar 10 rpm hızda 7 dakika mickle (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) cihazında mekanik lizise uğratıldı.

7-Daha sonra, 12000 x g hızda 10 dakika santrifüj edildi.

8- Süpernatanttan 200 µl alınıp ve yeni bir ependorfa aktarma yapıldıktan sonra, spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapıldı ve örnekler, PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Endoservikal ve Vajinal Sürüntü Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu ve Numune Hazırlama

Farklı klinik örnekler ve mikoplazma suşlarından DNA izolasyonu Cadieux et al. (56) protokolüne uygun olarak aşağıdaki basamaklar izlenerek elde edildi;

1-Örnek, 14000 rpm'de 20 dakika santrifüje tabi tutuldu,

2-PBS'de (0.1 M-NaCl, 2.5 mM-KCl, 10 mM-Na₂HPO₄, 1.5 mM-KH₂PO₄, pH: 7,4) yıkandı,

3-Yıkandıktan sonra 60 µl distile su içinde yeniden süspanse edildi.

4- Örnek daha sonra 10 dakika kaynatıldı ve -20 °C'de saklandı.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Transportu

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'nde Mart 2016 ve Kasım 2016 tarihleri arasındaki 9 aylık periyotta takip edilen, erken membran rüptürü şüphesi,

amniyotik sıvı gelmesi, endoservikal akıntı-kanama, ağrı-sancı, yanma gibi herhangi bir semptomatik şüpheyle başvuran, 18 - 43 yaşları arasındaki ve 34 hafta ve öncesi preterm doğum riski bulunan gebelerden alınan amniyotik sıvı-servikal ve vajinal sürüntü örnekleri alınarak gerçekleştirildi. Alınan örnekler hızla Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na ulaştırılarak çalışmaya başlandı.

3.3.1. Transport Besiyerleri

Hastalardan alınan örnekler *M. hominis* ve *U. urealyticum* selektif besiyerine ekildi. Bu besiyerleri 18 saat +4 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra buzdolabından çıkarılan transport vasatlar % 10 CO₂ ve % 9 N₂'lu atmosferde 37 °C'de 16-24 saat ön inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde vasatlardaki PH değişikliği üreme için kriter kabul edildi.

Üreme olan transport ortamdan steril pipet ile alınan örnekler spesifik katı *M. hominis* ve *U. urealyticum* vasatlarına ekildi. Yine aynı atmosferik şartlarda 48-72 saatlik inkübasyondan sonra tanı, kolonilerin X10 büyütme ile direk veya Dienes metodu ile boyanarak mikroskopik muayenesi ile konuldu.

3.3.1.1. *M. hominis* Selektif Transport Besiyeri

BHI Broth.....	6gr	(Merck, Lot: VM313793 132)
İnaktif at serumu.....	40cc	(GE Healthcare, Lot: B12211 2820)
Cycloheximide (%0,1)	0,2cc	(Sigma, Lot: BCBK3284V)
Penisilin (500x10 ³ U/cc).....	1cc	(Sigma, Lot: 115H1248)
Maya ektresi (%25).....	10cc	(LabM, Lot: Q38227/101)
Fenol kırmızısı (%0,2)	5cc	(Merck, Lot: 9709585)
Talyum asetat (1/80)	1cc	(Sigma, Lot: SLBC3990V)
Arginin monohidroklörür(%20).....	5cc	(Merck, Lot: K13216442)
Distile su.....	144cc	

BHI broth pH 7.8 ± 0.2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 40 °C'de filtrasyon ile sterilize edilen diğer solüsyon ve penisilin ilave edilerek 3'er cc'lik miktarlarda küçük tüplere dağıtıldı.

3.3.1.2. *U. urealyticum* Selektif Transport Besiyeri

Triptik soy broth.....	4,5gr	(Merck, Lot: VM058759 912)
İnaktif at serumu.....	40ml	(GE Healthcare, Lot: B12211 2820)
Cycloheximide (%0,1).....	0,2cc	(Sigma, Lot: BCBK3284V)
Penisilin (500.000 Ü).....	1cc	(Sigma, Lot: 115H1248)
Maya ekstresi (%25).....	10cc	(LabM, Lot: Q38227/101)
Üre (% 20).....	1cc	(Sigma, Lot: 72560)
Fenol kırmızısı (%0,2).....	4cc	(Merck, Lot: 9709585)
Distile su.....	144cc	

BHI broth pH 7.8 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavlandı. 40°C 'de filtrasyon ile sterilize edilen diğer solüsyon ve penisilin ilave edilerek 3'er cc'lik miktarlarda küçük tüplere dağıtıldı.

3.3.2. İzolasyon Besiyerleri

3.3.2.1. *M. hominis* Selektif İzolasyon Besiyeri

BHI Broth.....	6gr	(Merck, Lot: VM313793 132)
Nobel agar.....	1,5 gr	(BD Difco, Lot: 5106959)
İnaktif at serumu.....	40 cc	(GE Healthcare, Lot: B12211 2820)
Cycloheximide (% 0,1).....	0,2 cc	(Sigma, Lot: BCBK3284V)
Penisilin (500×10^3 U/cc).....	1 cc	(Sigma, Lot: 115H1248)
Maya ekstresi (%25).....	10 cc	(LabM, Lot: Q38227/101)
Fenol kırmızısı (%0,1).....	1 cc	(Merck, Lot: 9709585)
Talyum asetat (1/80)	2 cc	(Sigma, Lot: SLBC3990V)
Argininmonohidroklörür (%20).....	5 cc	(Merck, Lot: K13216442)
Distile su.....	144cc	

BHI broth ve Nobel agar karışımı pH 7.8 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavlandı. 40°C 'de filtrasyon ile sterilize edilen diğer solüsyon ve penisilin ilave edilerek 6 cm çapındaki petri kutularına steril şartlarda hava kabarcığı oluşturmamak için pipetle döküldü.

3.3.2.2. *U. urealyticum* Selektif İzolasyon Besiyeri

Triptik Soy Broth.....	4.5 gr	(Merck, Lot: VM058759 912)
------------------------	--------	----------------------------

Nobel agar.....	1,3 gr	(BD Difco, Lot: 5106959)
İnaktif at serumu.....	40 cc	(GE Healthcare, Lot: B12211 2820)
Cycloheximide (%0,1).....	0,2 cc	(Sigma, Lot: BCBK3284V)
Penisilin (500.000U).....	1 cc	(Sigma, Lot: 115H1248)
Maya ektresi (%25).....	6 cc	(LabM, Lot: Q38227/101)
Fenol kırmızısı(%0.1).....	4 cc	(Merck, Lot: 9709585)
Üre (%20).....	1 cc	(Sigma, Lot: 72560)
Distile su.....	144 cc	

Distile suya broth ve agar ilave edildikten sonra pH 6 ± 2 'ye ayarlanıp otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edildi. 40°C 'ye kadar soğutup diğer maddeler ilave edilerek ve 6 cm çapındaki petri kutularına steril şartlarda hava kabarcığı oluşturmamak için pipetle döküldü.

3.3.3. Dienes Boyama Metodu

Stok Dienes boyası hazırlama

Metilen mavisi.....	2,5 gr	(Merck, Lot: 4186570)
Azur II.....	1,25	(Merck, Lot: 109211)
Maltoz.....	10gr	(BD Difco, Lot: 0168 17)
Na_2CO_3	0,25 gr	(Merck, Lot: A774298)
Benzoik asit.....	0,20gr	(Merck, Lot: K1431030)
Deiyonize su.....	1000cc	

Boya, stoktan 1/10 oranında sulandırılarak filtre edildikten sonra pipet ile agar plağına damlatarak koloniler incelendi. Bu boya ile mikoplazma kolonileri, merkezi kısmı koyu, periferik kısmı açık olmak üzere iki belirgin zon halinde görüldü.

3.4. Fenotipik İdentifikasyon:

Amniyotik sıvı-servikal ve vajinal sürüntü örnekleri mikoplazma ve ureaplazma örneklerinin taşınabilmesi ve kültürünün gerçekleştirilebilmesi için özel olarak hazırlanan mikoplazma ve ureaplazma transport besiyerlerine alınarak hızla mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı.

Transportu sağlanan örnekler 18 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilerek soğukta zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Aynı örnekler % 10 CO_2 ve % 9 N_2 'lu

atmosferde 37 °C’de 16-24 saat ön inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde vasatlardaki pH değişikliği üreme için kriter kabul edildi. Transport besiyerinden steril pipet ile alınan örnekler spesifik *M. hominis* ve *U. urealyticum* vasatlarına ekilmiş ve yine aynı atmosferik şartlarda 48-72 saatlik inkübasyondan sonra tanı, kolonilerin X10 büyütme ile direk veya Dienes metodu ile boyanarak mikroskopik muayenesi ile konuldu.

İnkübasyon sonunda mikroorganizmanın tanısında tipik olan sahanda yumurta şeklinde görülen koloniler doğrudan mikroskop altında incelendi. Az sayıdaki mikroorganizmanın çoğaltılması amacı ile arjinin broth (Thermo, USA)’a inokülasyon yapılmış ve çoğaltılan örneklerden moleküler testlerin gerçekleştirilmesi için DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan besiyerlerindeki üreme *M. hominis* ATCC suşu 15488 ile kontrol edildi.

Tablo 3.1. In-House PCR yönteminde kullanılan primerler

Bakteri adı	Primer adı	Primerler (F/R)	Primer (bp)	Kaynak
<i>M. hominis</i> 16S	16S	5'-ATGAGGGTGCAGAACATTAG-3' 5'-TAATTCCGGATAACGCTTGC-3'	336	Allen-Daniels et al.(6)
<i>M. hominis</i>	arl	5'-CTGGCGGAAATTCATAAGC-3' 5'-ATCGCATCAAACATCGTGTC-3'	307	Allen-Daniels et al.(6)
<i>M. hominis</i>	goiB	5'-CGCCAAACTATGCACGCATTTAT-3' 5'-GGTTATCCTTTGGCCTCATAGTA-3')	173	Allen-Daniels et al.(6)
<i>M. hominis</i>	goiC	5'-CCTTACGATATATGGTTGTTTCG-3' 5'-CTAACTTAAATCATCAAGAGTACGG-3'	-	Allen-Daniels et al.(6)
<i>M. genitalium</i> 16S	MG16-45F MG16-447R	5'-TAC ATG CAA GTC GAT CGG AAG TAG C-3' 5'-AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG-3'	427	Jensen et al.(57)
<i>U. urealyticum</i> 16S	UR1 UR2	5'-GAGTGTAGTAGGGAGTTGGGGAATC-3' 5'-TCTTGCGAATGTACTACCCAGGCACA-3'	247	Aaltonen et al.(58)
<i>M. hyorhina</i> 16S-23S	F1 R1	5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3' 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT-3'	-	Tang et al.(59)
<i>M. hyorhina</i> 16S-23S	F2 R2	5'-GTG(C/G)GG(A/C)TGGATCACCTCCT -3' 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)CTT-3'	315	Tang et al.(59)
<i>C. trachomatis</i> 16S	KL1 KL2	5'-TCCGGAGCGAGTTACGAAGA-3' 5'-AATCAATGCCCGGGATTGGT-3'	241	Ghosh et al.(60)
<i>N. gonorrhoeae</i> 16S	SL67 SL59	5'-TAT CGG AAC GTA CCG GGT AGC-3' 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'	414	Farrell et al.(61)

3.5. Moleküler İdentifikasyon

Hastalara ait örneklerdeki mikroorganizmalara ait DNA ekstraktlarında 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde, *VspI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek mikoplazma suşlarının

doğrulanmasında, 16S rRNA pozitifliği tespit edilen *M. hominis* DNA ekstraktlarında membran rüptüründen sorumlu olduğu düşünülen *arl*, *goiB* ve *goiC* hedef bölgelerinin tesbiti için Tablo 3.1’de belirlenen primerler kullanılarak in-House PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Kültür Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Mycoplasma spp ve *Ureaplasma spp* olduğu belirlenen koloniler ile selektif katı besiyerlerinin tamamında yüzeyin 500µl 1X TE ile yıkanması sonucunda toplanan koloniler ile *M. hominis* ATCC 15488 susunun selektif agardaki kolonileri PCR ile amplifiye edilmek üzere kalıp DNA ekstraksiyonu için Cadieux et al. (56) yöntemine uygun olarak ve *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 susunun da çukolata agardaki kolonileri TE buffer içine alınarak mickle yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA örnekleri ekstrakte edildikten sonra, amplifikasyon reaksiyonu için her bir kalıp DNA’dan 5 µl ilave edildi ve 25 µl reaksiyon karışımı içerisinde gerçekleştirildi.

Mastermix.....12,5 µl

Primer (Her birinden).....0.25 µl

Distile su7 µl

Reaksiyon karışımı içeren ependorf tüpleri vortekslenerek karıştırıldıktan sonra amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (Applied Biosystems 2720 Termal Cycler) herbir bakteri grubu örnekleri için aşağıdaki döngü sıralarına göre yapılarak tamamlanmıştır.

3.5.2. In-House PCR ile *M. hominis* 16S rRNA Varlığının Araştırılması

M. hominis’in 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde ve 16S rRNA pozitifliği tespit edilen ve PCR-RFLP yöntemi ile doğrulaması yapılan *M. hominis* DNA ekstraktlarında, membran rüptüründen sorumlu olduğu düşünülen *arl*, *goiB* ve *goiC* hedef bölgelerinin araştırılması için Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon mixi

12.5 µl.....2XPCR mastermix (Thermo),

0,25 µl.....(10pco/mol) forward- revers primerler,

7 µl.....nükleaz free su

5 µl.....hedef DNA örneği kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR yöntemi

İlk denatürasyon	95°C’de 5 dakika	
Denatürasyon	94°C’de 1 dakika	} 40 siklus
Annealing (Bağlanma)	58°C’de 45 saniye	
Extention (Uzama)	72 °C’de 1 dakika	
Son extention (Uzama)	72 °C’de 10 dakika	

Elde edilen ampliconlar % 2’lik Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.3. In-House PCR ile *M. genitalium* 16S rRNA Varlığının Araştırılması

M. genitalium 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon mixi

12.5 µl.....2XPCR mastermix (Thermo),
0,25 µl.....(10pco/mol) forward- revers primerler,
7 µl.....nükleaz free su

5 µl.....hedef DNA örneği kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR yöntemi

İlk denatürasyon	94 °C’de 30 saniye	
Denatürasyon	94 °C’de 30 saniye	} 45 siklus
Annealing (Bağlanma)	60 °C’de 60 saniye	
Extention (Uzama)	72 °C’de 1 dakika	
Son extention (Uzama)	72 °C’de 5 dakika	

Elde edilen ampliconlar % 2’lik Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.4. In-House PCR ile *U. urealyticum* 16S rRNA Varlığının Araştırılması

U. urealyticum 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon mixi

12.5 µl.....2XPCR mastermix (Thermo),
0,25 µl.....(10pco/mol) forward- revers primerler,
7 µl.....nükleaz free su
5 µl.....hedef DNA örneği kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR yöntemi

İlk denatürasyon	94°C’de 1 dakika
Denatürasyon	94°C’de 30 saniye
Annealing (Bağlanma)	60°C’de 30 saniye
Extention (Uzama)	72 °C’de 1 dakika
Son extention (Uzama)	72 °C’de 5 dakika

45 siklus

Elde edilen amplikonlar % 2’lik Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.5.In-House PCR ile *M. hyorhinis* 16S-23S rRNA Varlığının Araştırılması

PCR-RFLP ile mikoplazmaların 16S-23S rRNA spacer bölgesi sekanslarını güçlendiren iki aşamalı PCR’da Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılmıştır.

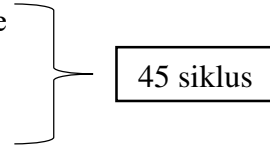
Reaksiyon mixi

12.5 µl.....2XPCR mastermix (Thermo),
0,25 µl.....(10pco/mol) forward- revers primerler,
7 µl.....nükleaz free su
5 µl.....hedef DNA örneği kullanılarak toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

İki aşamalı PCR reaksiyonu

Birinci aşama PCR için, 5 µl numune, iki dış primer çifti olan 45 µl reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. İkinci aşama PCR, birinci aşama PCR ürününün 1 µl’sini, iki iç primerli 49 µl reaksiyon karışımına ekleyerek gerçekleştirilmiştir.

PCR yöntemi (1.ve 2. aşama)

İlk denatürasyon	94 °C’de 30 saniye	
Denatürasyon	94 °C’de 30 saniye	
Annealing (Bağlanma)	55 °C’de 2 dakika	
Extention (Uzama)	72 °C’de 2 dakika	
Son extention (Uzama)	72 °C’de 5 dakika	

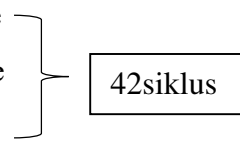
PCR ürün tanımlaması

İkinci aşama PCR amplikonlarının ebatları, % 2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Mikoplazma türlerinin farklılaşması, *VspI* (AseI R0526S Lot:0131509 BioLabs) ve / veya *HindIII* (R0104S Lot: 0711510 BioLabs) ile sindirim yoluyla gerçekleştirilmiş ve sindirim şekilleri % 2’lik agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

3.5.6. In-House PCR ile *C. trachomatis* Cryptic Plasmid 16S rRNA Varlığının Araştırılması

C. trachomatis Cryptic Plasmid 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR yöntemi

İlk denatürasyon	94 °C 5 dakika	
Denatürasyon	94 °C 45 saniye	
Annealing (Bağlanma)	55 °C 45 saniye	
Extention (Uzama)	72 °C 1 dakika	
Son extention (Uzama)	72 °C 5 dakika	

Elde edilen amplikonlar % 2’lik Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.5.7. In-House PCR ile *N. gonorrhoeae* 16S rRNA Varlığının Araştırılması

N. gonorrhoeae 16S rRNA gen bölgesinin tespitinde Tablo 3.1.’de belirlenen primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR yöntemi

İlk denatürasyon	94 °C 5 dakika	
Denatürasyon	94 °C 45 saniye	40 siklus
Annealing (Bağlanma)	55 °C 1 dakika	
Extention (Uzama)	72 °C 1 dakika	
Son extention (Uzama)	72 °C 5 dakika	

Elde edilen ampliconlar % 2'lik Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek marker bantları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin analizi için agaroz (Sigma, Lot: SLBL4377V) jel elektroforezi kullanılmıştır. PCR ürünleri; % 0.5 etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jelde, 120 voltluk elektrik akımının uygulandığı, elektroforez işleminden sonra jel görüntüleme sistemiyle değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi için jel, 1 x TBE içerisinde % 2 oranında agaroz ilave edilerek karışım homojen berraklık elde edilene kadar kaynatılmıştır. Oda ısısında yaklaşık 50-60 °C'ye kadar soğuyan agaroz jel içerisine 5 µl etidyum bromür eklenip karıştırılmıştır. PCR örneklerini yüklemek için gerekli olan kuyuları oluşturmak amacıyla, uygun olan tarak yerleştirilmiş ve agaroz jel agar tablasına dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaştıktan sonra, tarak çıkarılarak, içerisinde 1xTBE tamponu olan tank içerisine yerleştirilmiştir. Jel üzerindeki kuyulara, 10µL örnek ile 2 µl loading buffer (Bio-Rad) karıştırılarak yükleme yapılmıştır. Örnekleri doğru bir şekilde değerlendirebilmek amacıyla, molekül büyüklükleri bilinen marker DNA'lardan jelde yer alan iki kuyucuğa 10 µl yüklenmiştir. Marker ve örneklerin yüklenmesinden sonra, tank güç kaynağına (Biorad) bağlanmıştır. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak, 120 volt akım altında 75 dakika elektroforez işlemi sürdürülmüştür. Daha sonra, DNA bantları jel görüntüleme sistemi [Gel logic 1500 imaging system (ayrım gücü:1708x1280 pixel), Kodak Company, NY, USA] ile incelenmiş ve resimler TIFF formatında kaydedilmiştir.

Veillerin istatistiksel analizinde Continuity Correction ve Fisher's Exact testleri SPSS 17.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Değerleri $p \leq 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Polikliniği'ne, Mart 2016 ve Kasım 2016 tarihleri arasındaki 9 aylık periyotta, amniyotik sıvı gelmesi, endoservikal akıntı-kanama, ağrı-sancı, yanma gibi şikayetlerle başvuran ve erken membran rüptürü şüpheli ≤ 34 hafta (ortalama 31.6) gebeliği olan, 18-43 yaşları (ortalama 30.4) arasındaki 61 hamile kadından dacton eküvyonlar yardımı ile selektif transport besiyerleri içerisine alınan servikal ve vajinal sürüntü örnekleri ile ilk akım idrar numuneleri alındı. Bu kadınlarda önceki gebelik sayısı ortalama (1,9) ve önceki düşük sayısı ortalama (0,5) olarak tespit edildi.

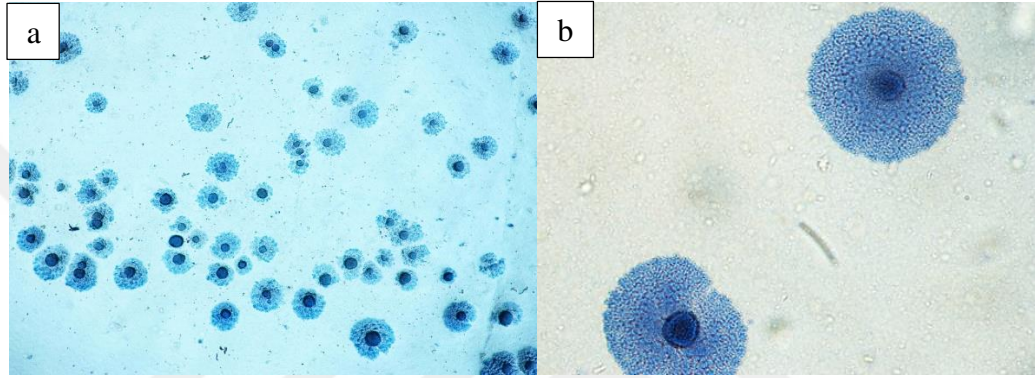
Kontrol grubu ≤ 34 hafta (ortalama 28.2) gebeliği olan, 19-39 yaşları (ortalama 29.6) arasındaki hamile kadından dacton eküvyonlar yardımı ile selektif transport besiyerleri içerisine alınan vajinal sürüntü örnekleri ile ilk akım idrar numuneleri alındı. Bu kadınlarda önceki gebelik sayısı ortalama (2,2) ve önceki düşük sayısı ortalama (0,5) olarak tespit edildi.

Gebelerin yaş grubuna göre dağılımında, hasta ve kontrol grubunda en yüksek grubu sırası ile % 52.5 ve % 52.4 olarak 18-30 yaş grubu oluşturdu. Gestasyon yaş grupları arasında en sık görülen gestasyon yaşı da % 72.1 ve % 42.9 ile >30 grubunda yer aldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen gebelerin yaş grupları ve gestasyon yaşlarına göre dağılımı

Yaş grubu		Gestasyon Yaşı (Hafta)						TOPLAM	
		< 16		16-30		>30			
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Hasta	18-30	2	6.3	8	25	22	68.8	32	52.5
	31-40	2	8.3	4	16.7	18	75	24	39.3
	>40	0	0	1	20	4	80	5	8.2
	Toplam	4	6.6	13	21.3	44	72.1	61	74.4
Kontrol	18-30	2	18.2	2	18.2	7	63.6	11	52.4
	31-40	3	30.0	5	50.0	2	20.0	10	47.6
	>40	0	0	0	0	0	0	0	0
	Toplam	5	23.8	7	33.3	9	42.9	21	25.6
TOPLAM		9	11.0	20	24.4	53	64.6	82	100

Selektif katı besiyerlerinde üreyen ve Dienes boyası ile boyanmış mikoplazma için karakteristik koloni morfolojisi gösteren bütün üremeler, fenotipik ileri identifikasyonun gecikmesi ve aslında bu yöntemlerin de duyarlılığının düşük olması sebebi ile hastaya erken tanı amaçlı olarak *M. genitalium* olarak rapor edilmiştir (Şekil-4.1a,1b). *U. urealyticum* selektif besiyerinde üreyen cam kırığı görünümlü kolonilerde fenotipik olarak *U. urealyticum* olarak rapor edilmiştir. Bu örneklerle ait PCR sonuçları ile kesin tür identifikasyonu yapıldıktan sonra raporlar yeniden düzenlenmiştir.



Şekil 4.1.a - 1.b. a.Dienes boyası ile boyanmış mikoplazma kolonileri 10x10 büyütme
b.40x10 büyütme (Hasta no:36)

Hastalarımızın 6(% 9.8)'sının hem endoserviks hem de vajen sürüntü örneklerinden mikoplazma izolasyonu için kullandığımız selektif katı besiyerine yapılan ekimlerin inkübasyon süresi sonunda Dienes boyası ile boyanan tipik koloni morfolojileri tespit edilmiştir. Buna karşılık 5(% 8.2) hastanın sürüntü örneklerinde *U. urealyticum* üretilmiştir.

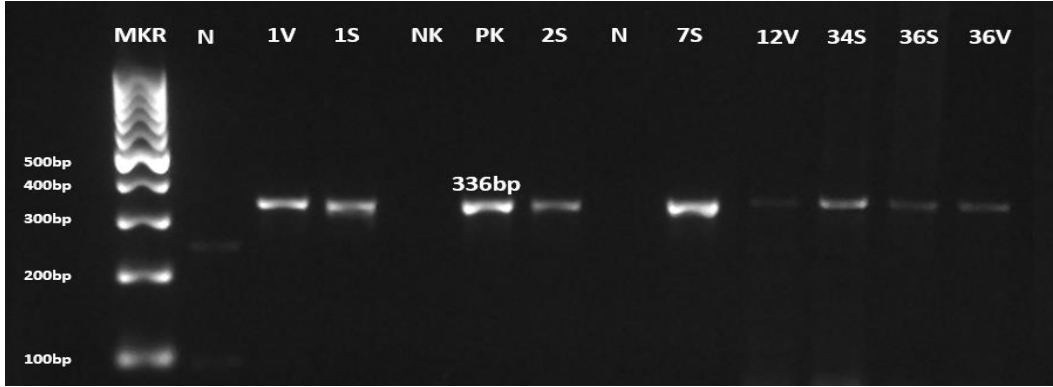
Her iki örneğinde mikoplazma üretilen 6 hastadan 1(% 1.6)'inde endoservikal ve vajinal sürüntü örneklerinde tek başına mikoplazma kolonizasyonu tespit edilmişken, 3 (% 4.9) hastanın her iki örneğinde mikoplazma ve ureaplasma birlikteliği tespit edilmiştir. Geri kalan 2(% 3.3) hastada ise endoservikal sürüntü örneklerinde mikoplazma ile ureaplasma birlik görülürken, bu hastaların vajinal sürüntü örneklerinde ureaplasma üretilmemiştir. Böylece mikoplazma pozitif olan 6 hastanın 5'inde ureaplasmanın da pozitif olduğu tespit edilmiş ve toplam 20 örnekte her iki mikroorganizmanın üretilmesi mümkün olmuştur. Kontrol grubunda 2 (% 9.5) gebenin vajinal sürüntü örneğinde mikoplazma ile ureaplasma birlikte görülmüştür. Vajinal örneklerden selektif katı besiyerlerinde üretilen *M. hominis* kültür pozitifliği, hasta ve

kontrol grubu karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.643) (Tablo 4.2).

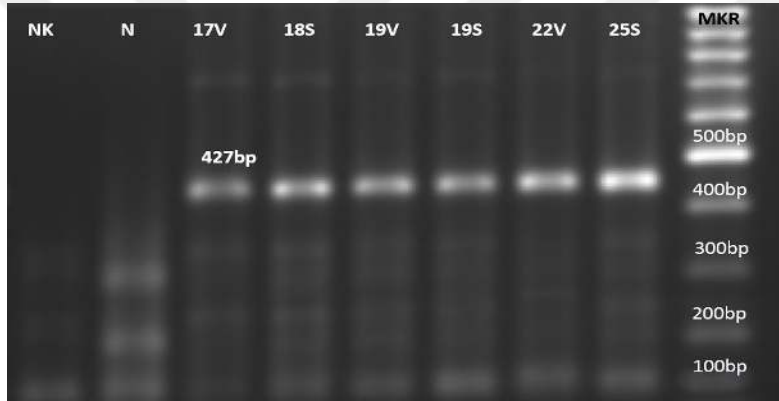
Tablo 4.2. Selektif katı besiyerlerinde görülen üremelerin örnekler dağılımı

Üreyen Mikroorganizma	Selektif katı besiyerlerinde görülen üremelerin hasta örneklerine dağılımı n=61						Kontrol Grubu n=21		Üreme görülen toplam mikroorganizma sayısı n=24	
	Vajen		Serviks		vajen+serviks		Vajen		Sayı	%
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
Mikoplazma	2	3.3	0	0	1	1.6	0	0	4	16.7
Üreaplasma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mikoplazma+ Üreaplasma	0	0	2	3.3	3	4.9	2	9.5	20	83.3
Üreme görülen toplam örnek sayısı	2	8.7	4	16.7	14	58.3	4	16.7	24	100

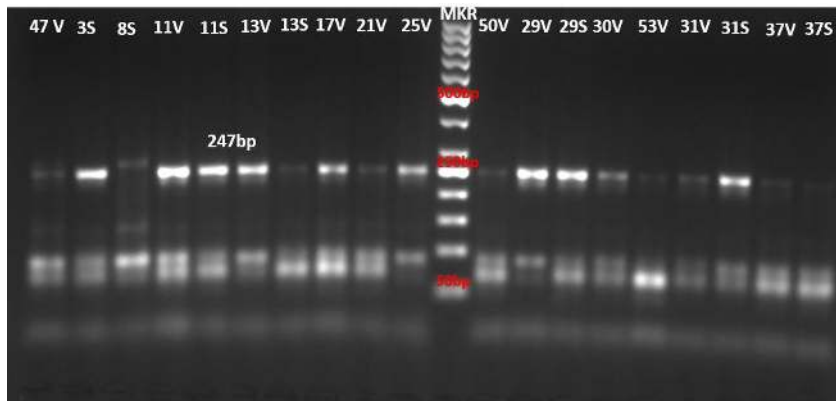
Hastalardan alınan sürüntü örneklerinin taşındığı ve ön zenginleştirme amacı ile +4C'de ~18-24 saat bekletilmiş sıvı besiyerlerinden alınan örnekler 500µl sıvı besiyeri ile selektif katı besiyerlerinin tamamında yüzeyin 500µl 1X TE ile yıkanması sonucunda toplanan koloniler PCR ile amplifiye edilmek üzere kalıp DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Kalıp DNA örnekleri de *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* genomundaki tür spesifik gen bölgelerini tanıyan kısa oligonükleotid dizileri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi (Şekil 4.2, 4.3, ve 4.4). Hasta grubunda tür spesifik PCR ile amplifikasyon sonucunda en yüksek hedef DNA dizi pozitifliği her üç mikroorganizma içinde sıvı transport besiyerinden elde edilen DNA örneklerinde olmak üzere; vajinal transportlarda % 75.4, servikal transport besiyeri örneklerinde % 67.2 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 4.3). Selektif katı besiyerlerinde ilginç olarak Mikoplazmaların tersine, *U. urealyticum* istatistiki yönden önem arz etmemekle beraber servikal sürüntü örneklerinde vajen örneklerinden daha yüksek oranda bulunmuştur. Kontrol grubundan elde edilen vajinal transportlarda hedef DNA dizi pozitifliği *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* için hasta grubuna benzer şekilde sıvı transport besiyerinden elde edilen DNA örneklerinde daha yüksek olmak üzere toplamda; % 38.0 ve selektif katı besiyerlerinde % 28.6 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 4.3). *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum*'un hasta ve kontrol grubundaki PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Sırası ile; p= 0.066, p= 0.598, p= 0.266).



Şekil 4.2. *M. hominis*'in 16S rRNA PCR sonucunda elde edilen band görüntüleri **MKR:** Marker, **V:** Vajen örnekleri, **S:** Serviks örnekleri, **N:** Negatif örnekler. **NK:** Negatif kontrol **PK:** Pozitif kontrol, *M. hominis* ATCC 15488 suşu pozitif örnekler 336bp'de görülmektedir.



Şekil 4.3. *M. genitalium* 16S rRNA PCR sonucunda 427bp'de elde edilen band görüntüleri **MKR:** Marker, **V:** Vajen örnekleri, **S:** Serviks örnekleri, **N:** Negatif örnekler. **NK:** Negatif kontrol **PK:** Pozitif kontrol



Şekil 4.4. *U. urealyticum* 16S rRNA PCR sonucunda 247bp'de elde edilen band görüntüleri **MKR:** Marker, **V:** Vajen örnekleri, **S:** Serviks örnekleri.

Tablo 4.3. Sıvı transport besiyeri ve üretme amaçlı katı besiyerinden hazırlanan DNA ekstraktlarında PCR ile hedef mikroorganizma DNA dizilerinin pozitiflik oranları dağılımı

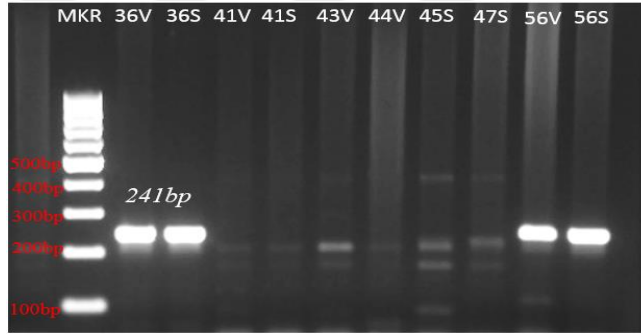
Spesifik DNA band pozitifliği	Sıvı transport besiyeri				Katı besiyeri			
	Servikal sürüntü örneği n=61		Vajinal sürüntü örneği n=61		Servikal sürüntü örneği n=61		Vajinal sürüntü örneği n=61	
Hasta Grubu	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>M. hominis</i>	22	36.1	24	39.3	3	4.9	4	6.6
<i>M. genitalium</i>	3	4.9	3	4.9	3	4.9	2	3.3
<i>U. urealyticum</i>	16	26.2	19	31.1	5	8.2	3	4.9
Toplam	41	67.2	46	75.4	11	18.0	9	14.8
Kontrol Grubu	Sıvı transport besiyeri Vajinal sürüntü örneği n=21/%				Katı besiyeri Vajinal sürüntü örneği n=21/%			
<i>M. hominis</i>	3		14.3		2		9.5	
<i>M. genitalium</i>	2		9.5		2		9.5	
<i>U. urealyticum</i>	3		14.3		2		9.5	
Toplam	8		38.0		6		28.6	
Genel Toplam	54		65.9		15		18.3	

Genital mikoplazma kolonizasyonu ve gebelik anomalileri arasındaki muhtemel ilişkiye ait yorumlarımızı, her iki tür içinde en yüksek kolonizasyon oranının tespit edildiği, vajinal sürüntü transport besiyerlerinden elde ettiğimiz pozitiflik oranları üzerinden yapmayı doğru bulduk. Böylece hastalarımızda en yüksek oranda genital kolonizasyonun 24(% 39.3) olguda *M. hominis* olduğu, bunu 19(% 31.1) olgu ile *U. urealyticum*'un izlediği görülmüştür. Sonuç olarak 24 hastamızda en az bir hedef DNA dizisi tespit edilmiştir.

Tür spesifik primerlerin kullanılması sonucu yapılan genotipik identifikasyonda koloni morfolojilerine göre tanımlanıp hem endoserviks hemde vajen sürüntü örneklerinde *M. genitalium* kolonizasyonu tespit edilen 6 hastanın tamamının PCR ile de pozitif olduğu, ancak bu hastalardan sadece 3(% 4.9)'ünde *M. genitalium* için spesifik band profili veren kolonizasyon görüldüğü diğer 3(% 4.9) hastanın sürüntü örneklerindeki hedef band profilinin *M. hominis* ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. *M. genitalium* ve ureaplazma sadece bir hastada *M. hominis* kolonizasyonundan bağımsız olarak tanımlanmış, bu hasta dışında *M. genitalium* ve ureaplazma kolonizasyonu tespit edilen hastaların tamamının *M. hominis* kolonizasyonu görülen hastalar oldukları tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Bu sonuçlara dayanarak kültür pozitifliği altın standart olarak kabul edilirse PCR'ın sensitivitesinin % 100 spesifitesinin ise oldukça düşük % 66.7 olduğu görüldü. Ancak hedef mikroorganizmaların fizyolojik özellikleri ve kültür karakterleri dikkate alındığında PCR'ın bütün müşkülpesent mikroorganizmaların

tanısında daha duyarlı olduğu ön kabulünden hareket edilirse, yani PCR sonuçları altın standart olarak baz alınır, kültürün duyarlılığının düşük % 85.7 spesifitesinin % 95.9 yüksek olduğu görüldü.

Mikoplazma ve ureaplazma dışında gebelik anomalileri ile en sık birlikte anılan iki mikroorganizma olan *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* genital kolonizasyon insidansını da bu çalışmanın tartışmasının daha objektif sonuçlara dayatılması düşüncesi ile tek tüp in-House PCR yöntemi ile araştırdık. Bu iki mikroorganizma için ilk akım idrarın ideal örnek olarak tanımlanmış olması sebebi ile bu mikroorganizmalara ait spesifik diziler, vajinal ve endoservikal sürüntü örneklerinin yanı sıra, hastalara ait ilk akım idrar örneklerinden de araştırılmıştır. Hastalarımızın 10(% 16.4)'unda hem vajinal hemde endoservikal sürüntü örneklerinde *C. trachomatis* tespit edilirken (Şekil 4.5), idrar örneklerinin hiç birisinde *C. trachomatis* için hedeflenen spesifik DNA band profili elde edilememiştir. *N. gonorrhoeae*'ya ait hedef DNA band profili ise hastaların hiç birisinde üç örnek türünde de gösterilememiştir. Kontrol grubunda iki gebede *M. hominis*, *M. genitalium* ve *U. urealyticum* birlikte tespit edilirken, bir gebede ise *M. hominis*, *U. urealyticum* ve *C. trachomatis* birlikteliği gösterilmiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.5. *C. trachomatis* 16S rRNA PCR sonucunda 241bp'de elde edilen band görüntüleri
MKR: Marker, **V:** Vajen örnekleri, **S:** Serviks örnekleri.

Tablo 4.4. Gebelerden izole edilen çoklu mikroorganizmaların dağılımı

Hasta Grubu						
İki bakteri n (%)				Üç bakteri n (%)		Dört Bakteri n (%)
<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. genitalium</i>
				<i>U. urealyticum</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>U. urealyticum</i>
						<i>C. trachomatis</i>
7 (11.5)	5 (8.2)	3 (4.9)	1 (1.6)	4 (6.5)	3 (4.9)	1 (1.6)
Kontrol grubu						
0	0	0	0	2 (9.5)	1 (4.8)	0

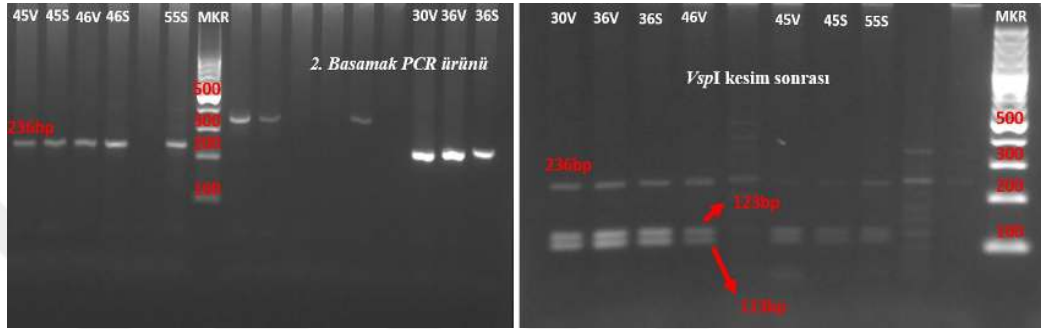
Çalışma sırasında hastalardan toplanan klinik örneklerde PCR sonuçlarına göre hedef mikroorganizma kolonizasyon oranlarının, ilk gebelik ve düşük öyküleri dikkate alınarak incelendiğinde, en fazla mikroorganizmanın, daha önce düşük öyküsü olmayan 28(% 45.9) gebenin bulunduğu grupta olduğu tespit edildi. Bu gruptaki hastalarda en yüksek oranda tespit edilen mikroorganizmaların 8(% 28.6)'er olguda *M. hominis* ve *U. urealyticum* olduğu görüldü. Kontrol grubunda da benzer şekilde daha önce düşük öyküsü olmayan 10(% 47.6) gebenin bulunduğu grupta olduğu tespit edildi. Bu gruptaki gebelerde en yüksek oranda tespit edilen mikroorganizmanın 5(% 50.0) olgu ile *C. trachomatis* olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grubundaki *C. trachomatis* PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.064$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. İlk gebelik ve daha önce düşük öykülerine göre mikroorganizmaların PCR pozitif sonuçların dağılımı

Düşük Durumu	Vaka sayısı n (%)	<i>M. hominis</i>		<i>M. genitalium</i>		<i>U. urealyticum</i>		<i>C. trachomatis</i>		Toplam	
Hasta Grubu		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
İlk gebelik	12(19.7)	6	50	0	0	3	25	1	8.3	10	16.4
Daha önce düşük yok	28(45.9)	8	28.6	2	7.1	8	28.6	6	21.4	24	39.3
Daha önce bir düşük	13(21.3)	7	53.8	1	7.7	4	30.8	2	15.4	14	23.0
Daha önce iki düşük	8(13.1)	3	37.5	0	0	4	50	1	12.5	8	13.1
Toplam	61	24	39.3	3	4.9	19	31.1	10	16.4	56	91.8
Kontrol grubu											
İlk gebelik	4(19.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Daha önce düşük yok	10(47.6)	1	10.0	1	10	1	10.0	5	50.0	8	38.1
Daha önce bir düşük	4(19.0)	1	25.0	0	0	1	25.0	2	50.0	4	19.0
Daha önce iki düşük	3(14.3)	1	33.3	1	33.3	1	33.3	1	33.3	4	19.0
Toplam	21	3	14.3	2	9.5	3	14.3	8	38.1	16	76.2
Genel Toplam	82	27	32.9	5	6.1	22	26.8	18	21.9	72	87.8

M. hominis ve *M. hyorhins*'in 16S-23S rRNA spacer bölge dizilerini çoğaltmaya yönelik olarak spesifik primerler ile iki aşamalı PCR gerçekleştirilmiştir (59).

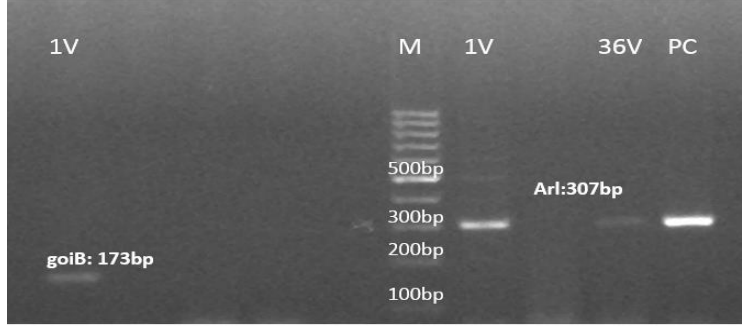
PCR sonucunda, *M. hominis* 236bp'de görüntülenmiş ve elde edilen amplikonlar, *VspI* enzimi ile kesilerek 113bp ve 123bp'deki band profilleri de gösterilmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7) *M. hyorhins*'e ait olan ve 315bp büyüklüğünde beklenen band profili ise görülmemiştir.



Şekil 4.6. İki aşamalı 16-23S rRNA PCR sonucu *M. hominis* 236bp'de band görüntüleri
MKR: Marker, **V:** Vajen örnekleri, **S:** Serviks örnekleri.

Şekil.4.7. *VspI* enzimi ile kesim sonrası 113 ve 123bp büyüklüğündeki *M. hominis* band görüntüleri

Hastaların her iki örneğiden sıvı ve selektif katı besiyerlerinde üretilen ve spesifik primerler kullanarak in-House PCR yöntemi ile *M. hominis* olduğu tespit edilen DNA ekstraktlarında, bazı çalışmalarda erken membran rüptüründen sorumlu olduğu ileri sürülen *arl*, *goiB* ve *goiC*'yi spesifik primerler kullanarak in-House PCR yöntemi ile araştırdık. *M. hominis* ile *M. genitalium* ve *C. trachomatis*'in birlikte tespit edildiği bir hasta ve yine *M. hominis* ile birlikte *M. genitalium*, *U. urealyticum* ve *C. trachomatis*'in için spesifik gen dizilerinin tespit edildiği bir diğer hastada *arl* pozitifliği tespit ettik (Tablo 4.6). Buna karşılık *M. hominis* hedef DNA dizileri gösterilen diğer hastalara ait sürüntü ekstraktlarının hiç birisinde *goiB* ve *goiC* hedef dizilerini tespit edemedik. Kontrol grubunda *M. hominis* ile birlikte *M. genitalium* ve *U. urealyticum*'un birlikte tespit edildiği bir gebede spesifik gen dizilerinin tespit edildiği bir hastada *arl* ve *goiB* pozitifliği tespit ederken (Şekil 4.8), *goiC* hedef dizilerini tespit edemedik (Tablo 4.6).



Şekil 4.8. *M. hominis* *arl* ve *goiB* pozitif ve negatif örneklerin PCR görüntüsü.
M: Marker, **V:** Vajen örnekleri, **PC:** Pozitif kontrol, *M. hominis* ATCC 15488 suşu görülmektedir.

Tablo 4.6. Gebelerden izole edilen *M. hominis*'lerde *arl*, *goiB* ve *goiC* dağılımı

Hasta Grubu				
<i>M. hominis</i>	Vaka sayısı (n)	<i>arl</i> (n)	<i>goiB</i> (n)	<i>goiC</i> (n)
Vajen	8	1	0	0
Serviks	6	0	0	0
Vajen + Serviks	16	1	0	0
Kontrol grubu				
Vajen	3	1	1	0

5. TARTIŞMA

M. hominis ve *U. urealyticum* vajinal floranın en yaygın üyelerinden olan bakterilerdir, ancak flora üyesi olmalarına rağmen altta yatan faktörlere bağlı olarak fırsatçı enfeksiyon etkenleri olarak bakteriyel vajinoza, gebelerde inflamasyon ile seyreden intraamniotik enfeksiyonlara, erken membran rüptürüne ve preterm abortusa neden olmaktadır. Erken doğum, 37. gebelik haftasından önce meydana gelen uterusun kasılabilirliği, servikal olgunlaşma ve/veya membran rüptürü ile karakterize klinik bir sendromdur. Erken doğumun, perinatal mortalitenin % 75'ini, uzun vadeli morbiditenin de % 50'sini oluşturduğu ve özellikle gelişmiş ülkelerde artış gösterdiği belirtilmektedir. Erken doğum mekanizması çok faktörlüdür ve enfeksiyon kaynaklı olabileceği gibi vasküler hasar, rahim distansiyonu, anormal allojenik tanıma ve stresten kaynaklanabilmektedir (3,6,35,62,63).

Çalışmalar preterm doğum ile üst genital bölgenin bakteriyel enfeksiyonları, histolojik koryoamniyonit ve doğal bağışıklığın uyarılması ile seviyesi artan intraamniotik biyokimyasal belirteçler arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. İntrauterin enfeksiyonlar genellikle vajina ve serviksten yukarı çıkarak, plasenta yoluyla hematogen dağılımla, sezeryan gibi invaziv işlemler sırasında kazara ya da fallop tüpleri aracılığıyla retrograd olarak yayılım göstermektedir. Birçok araştırmacı, mikroorganizmaların alt genital bölgeden üst bölgeye ikinci trimestirde çıktığına inanmaktadır, ancak kesin zamanlama henüz belirlenememiştir. Çok sayıdaki çalışmada genital mikoplazma sebebi ile gelişen intrauterin enfeksiyonlarda diğer mikroorganizmalara nazaran inflamatuvar cevabın daha yoğun olduğu, *M. hominis* ve *U. urealyticum*'un preterm doğumu tetiklediği gösterilmiştir (6,34,35,62).

M. hominis'in genellikle korioamniyonit ve erken doğumla sonuçlanan amniotik kavite ve gestasyonel dokulara girişinde kullandığı patolojik yol tam olarak belirlenememiştir ancak, *M. hominis* suşları arasındaki genetik farklılıkların amniyotik kavite ve plasentaya invazyon ve kolonizasyon potansiyelinde rol oynadığı düşünülmektedir. Sadece amniyotik sıvı ve plasentadan izole edilen suşlarda spesifik genlerin bulunması da bu düşüncüyü desteklemektedir. *M. hominis*'in amniyotik kaviteye invazyonunun erken doğum ile ilişkisi açık olarak belirtilmektedir ancak vajinal kolonizasyonunun erken doğum için güçlü bir etkiye sahip olup olmadığı

literatürdeki farklı bulgulara bağlı olarak henüz açık değildir. Mikoplazmanın erken dönemde tedavi edilmesi erken doğum riskini azaltabilmektedir. Bu nedenle kolonizasyon ve patojeniteyi ayırt etmeyi sağlayacak ve erken tanıyı kolaylaştıracak gen bölgelerinin tespit edilmesi *M. hominis*'in oluşturacağı morbidite ve mortaliteyi azaltabilecektir (6,64).

M. hominis ve *U. urealyticum* ile kolonizasyon doğum sırasında gerçekleşmekte ve yenidoğanların çoğunda spontan olarak temizlenirken, az sayıdaki olguda da persistan kolonizasyon oluşturmaktadır. Bununla birlikte cinsel olarak aktif bireylerde mikoplazma kolonizasyon oranları artmakta, sağlıklı kadınların % 15'inde *M. hominis* ve % 45-75'inde *U. urealyticum* kolonizasyonu görülmektedir. Taşıyıcılar asemptomatiktir, ancak altta yatan bazı faktörlere bağlı olarak mikroorganizmalar fırsatçı patojenlere dönüşebilmektedir (35,62).

Preterm doğum, perinatolojide çok büyük bir sağlık problemidir. Bu nedenle doğum öncesi dönemde erken doğumu önleme çabaları gösterilmektedir, çünkü risk altındaki hamile kadınların seçimi ve prematüre doğumun önlenmesi perinatal morbidite ve mortalite oranını önemli ölçüde düşürmektedir. Enfeksiyon ve preterm doğum arasındaki bağlantı pek çok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Serviks kanal enfeksiyonu, serviksteki değişiklikler ve fetal membranların erken rüptürü, yani erken doğum eylemi ile ilişkilidir. Gebelik öncesi enfeksiyon taramasının, aile hekimleri ve jinekologların başlıca görevi olması gerektiği bildirilmiştir (65).

Agger et al. (66) Amerika'da 2014'de yaşları 18-44 arasında değişen 676 gebenin servikal ve idrar örneklerindeki potansiyel patojenler için mikroskopi, kültür ve PCR ile incelemişler; 54(% 8,0) preterm doğum bildirmişlerdir. Bunların: % 12,1'i büyük, % 8,8'i orta ölçekli, % 9,4'ü küçük şehir ve % 2,3'ü kırsal yerleşim yerinde bulunduğunu ve ürogenital enfeksiyon oranlarının, özellikle de *M. hominis* ve *U. parvum*'un büyük kentsel yerleşimde en yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yerleşim yerleri arasındaki bu farklılıkların, özellikle gebeliğin 35 haftasından daha önce preterm doğum yapanların çevresel (azınlık etnik yapı, çoklu enfeksiyonlar ve bazı tarihi faktörler), genetik, epidemiyolojik ve patojenik vajinal bakterilerle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Maleki et al. (67) İran'da 2013'de düşük yapan gebelerde, yaşa dayalı istatistiksel analizde, üriner örneklerde 30-34 ve 35-39 yaş arasında kadınlarda sırasıyla; *M. hominis* % 71.4 ve *U. urealyticum* % 60 ile daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Benzer

şekilde, genital örneklerde de; 28-33 ve 34-39 yaş grubundaki kadınlarda sırasıyla; *M. hominis* % 54.5 ve *U. urealyticum* % 53.8 ile daha yüksek olduğunu ve çalışmalarında, düşük ile ürogenital enfeksiyonlar arasındaki güçlü bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızdaki örnekler; hasta grubunda % 52.5'si, kontrol grubunda da % 52.4'ü 18-30 yaş grubunda yer alan gebe kadınlardan alındı. Çalışmaya dahil edilen gebelerde gestasyon yaş ortalaması; hasta grubunun % 72.1 ile kontrol grubunun % 42.9'unda 30 haftadan büyüktü (Tablo 4.1). Biz kültür yöntemi ile; *M. hominis*'i hasta örneklerinde % 9.8, kontrol örneklerinde % 9.5, *U. urealyticum*'u hasta örneklerinde % 8.2, kontrol örneklerinde % 9.5 ve *M. genitalium*'u hasta örneklerinde % 4.9, kontrol örneklerinde % 9.5 olarak bulduk.

İlimizden Shokouhizadeh ve ark. (68) 1992'de gebe kadınların maternal kanalından örnek alarak yaptıkları selektif kültür çalışmalarında *U. urealyticum*'u % 44 ve *M. hominis*'i % 27,1 oranlarında bildirmişlerdir.

İlimizden yine Serin ve ark. (69) 2001'de yaptıkları çalışmalarında seçici mikoplazma izolasyon besiyeri kullanarak % 26 genital sürüntüden ve % 11 idrar örneğinden izole etmişlerdir. *M. hominis* ve *M. fermentans*'ın hedef genomik dizinleri kullanarak sırasıyla % 37 ve % 3 olarak bildirmişlerdir.

İlimizden Kibar ve ark. (70) 2005'de poster olarak sundukları çalışmalarında, genital akıntı yakınması olan kadınlarda kültür yöntemi ile *M. hominis* % 12 ve *U. urealyticum* % 45 olarak bildirmişlerdir.

Bengisun ve ark. (71) Ankara'da 1996'da selektif kültür yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında; gebe grubundaki hastalalarda mikoplazma % 2.7, ureaplazma % 29.72 ve mikoplazma+ ureaplazma % 21.62 oranlarında izole ederken, gebe olmayan grupta bu oranları sırasıyla % 1.07, % 25.8 ve % 17.2 olarak bildirmişlerdir.

Bayraktar ve ark. (17) Malatya'da 2010'da *Mycoplasma* IST-2 kiti ve A7 *Mycoplasma* agar kullanarak semptomatik ve asemptomatik gebelerin endoservikal örneklerinden elde ettikleri kültür sonuçlarını *M. hominis* için % 5 ve *U. urealyticum* için % 27 olarak bildirmişlerdir.

Wasiela et al. (72) Polonya'da 2003'de yaptıkları çalışmada eküvyonla alınan servikal örneklerden kültür yöntemi ile mikoplazmaların varlığı ile erken doğum arasındaki ilişkiye bakmışlar; % 16.7 *M. hominis* ve % 21.3 oranında *U. urealyticum*

tespit etmişlerdir. Term ve preterm olguları karşılaştırarak, preterm doğum olgularının mikoplazma varlığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Vouga et al. (64) İsviçre’de 2014’de yaptıkları çalışmalarında gebelik haftası 25-37 olan, potansiyel doğum komplikasyonlarının semptomlarını gösteren gebelerdeki bakterilerin varlığını göstermek için A7 *Mycoplasma* agar kullanarak kültürle rutin olarak taramışlar, preterm doğum görülen kadınlarda kolonizasyonu sırasıyla; *Ureaplasma spp* ve *M. hominis* için % 40,9 ve % 37,7 olarak bildirmişlerdir.

Kacerovský et al. (73) Prag’ta 2009’da yaptıkları çalışmalarında gebeliğin 24. ve 36. haftaları arasında PPRM ile 225 kadın üzerinde çalışmışlar. Genital mikoplazmalar için servikal sürüntüler almışlar ve hastaların kabulü sırasında standart vajinal bakteri kültürü yapmışlardır. *U. urealyticum* % 68 (152/225) ve 24-36. gebelik haftaları arasında PPRM’lu hastaların % 28’inde (63/225) *M. hominis* tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bulgularında; genital mikoplazmalarla servikal kolonizasyon ve membranlarda preterm erken rüptür arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Lee et al. (34) Kore’de 2016’da genital mikoplazmaları tespit etmek için *Mycoplasma* IST-2 kiti ve A7 *Mycoplasma* agar kullanarak 1035 gebenin vajinal numunelerinde toplam 571 *M. hominis* ve/veya *U. urealyticum* tespit etmişlerdir. Bunlardan, iki örnekte (% 0.2) *M. hominis*, 472(% 45.6) örnekte *U. urealyticum* tespit etmişlerdir. Kalan 97(% 9.4) örnekte hem *M. hominis* hem de *U. urealyticum* pozitif bulmuşlardır. Prematüre doğumlar, *M. hominis* ve *U. urealyticum*’un karışık enfeksiyonu olan vakalarında sıklıkla görülmüş ve *U. urealyticum* vakalarında preterm erken membran rüptürünün sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da; hastalarımızın 6(% 9.8)’sının hem endoserviks hem de vajen sürüntü örneklerinden mikoplazma izolasyonu için kullandığımız selektif katı besiyerine yapılan ekimlerin inkübasyon süresi sonunda Dienes boyası ile boyanan tipik koloni morfolojileri tespit edilmiştir. Buna karşılık 5(% 8.2) hastanın sürüntü örneklerinde *U. urealyticum* üretilmiştir. Kontrol grubunda 2 olgunun (% 9.5) vaginal sürüntü örneklerinde hem mikoplazma hem de ureaplazma tespit edilmiştir. Sonuçlarımız mikoplazma açısından ülkemizden Shokouhizadeh ve ark. (68), Serin ark. (69), Bengisun ve ark. (71) ile yabancı ülkelerdeki araştırmacılarından Wasiela et al. (72), Vouga et al. (64) ve Kacerovský et al. (73) çalışmalarından daha düşük, Kibar ve ark. (70) sonuçları ile uyumlu iken, Bayraktar ve ark. (17) ile Lee et al. (34) çalışmalarından

yüksek orandadır. *U. urealyticum* açısından sonuçlarımız diğer araştırmacılardan düşük bulunmuştur. Bu durum hasta popülasyonunun özelliklerine ve kullanılan yöntemlerin laboratuvarlar arasındaki standardizasyonun farklılığına bağlı olabilir. Vajinal örneklerden selektif katı besiyerlerinde üretilen *M. hominis* kültür pozitifliği, hasta ve kontrol grubundaki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.643$) olmamakla beraber özellikle gebelerde bu mikroorganizmanın yüksek oranlarda tespit edilmiş olması klinik açıdan son derece önemlidir.

PCR tekniği, toplandıktan hemen sonra analiz edilen numunedeki kültürden, daha duyarlı olarak tanımlanmıştır. Yenidoğana doğumda ureaplazma bulaşırsa, organizmanın ilk günde düşük yoğunlukta olduğu ve zamanla arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, erken teşhisin önemli olduğu ve antibiyotik tedavi protokollerinin tasarlanmasında PCR'ın mükemmel fayda sağlayabileceği ve hızlı tanı testinin PCR olduğu bildirilmiştir. Buna rağmen, her bir yöntemin bazı avantaj ve dezavantajların olduğu bildirilmiştir. Özel zengin ortamlar ve büyüme koşullarına gerek duyulduğundan, mikoplazma ve ureaplazmaların kültür yönteminin zor, pahalı ve zaman alıcı olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, güvenilirlik, bu organizmaları tespit etmede kolay ve hızlı olmanın avantajlarına sahip olan PCR tekniği ile sınırlıdır. Sonuç olarak, kültür metodu bu organizmalarının izolasyonunda ve tanımlanmasında spesifik metot olarak kalmaktadır, çünkü tespit edilemeyen özelliklere sahip ve tanı koydurucu özelliğe sahip olmayan koloniler oluşmaktadır (2-4,18,28,29,32,35,74).

Gerber et al. (75) 2003'de yaptıkları çalışmada preterm doğum ile *U. urealyticum* arasındaki ilişkiyi araştırmak için sağlıklı gebeler ile ardışık doğum yapan gebeleri karşılaştırmışlardır. Asemptomatik 254 gebeden gebeliklerinin 15-17. haftalarında transabdominal amniyosentez ile topladıkları amniyotik sıvıda PCR ile % 11.4 oranında *U. urealyticum* bulmuşlardır. Ardışık doğum yapan *U. urealyticum* pozitif bulunan gebelerin % 58.6'sında, *U. urealyticum* negatif bulunanların ise % 4.4'ünde preterm doğum gerçekleştiği ve önceki gebelikleri preterm doğum ile sonuçlananların da *U. urealyticum* pozitifliğinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Nguyen et al. (76) 2004'de yaptıkları çalışmada 456 hastada 15-17. gebelik haftasında transabdominal amniyosentez ile alınan amnion sıvısında *M. hominis* varlığını PCR yöntemi ile araştırmışlar ve 29(% 6.4) hastanın amnion sıvısında *M. hominis* tespit etmişlerdir. Amnion sıvısında *M. hominis* pozitifliği tespit edilen hastalarda preterm

doğum oranı (% 14.3) negatif olan hastalara göre (% 3.3) daha yüksek bulunmuştur. İkinci trimesterde amnios sıvısında *M. hominis* pozitif olmasının preterm eylem ve doğum riskini arttırdığını bildirmişlerdir.

Paramel Jayaprakash et al. (77) Kanada'da 2016'da yaptıkları çalışmalarında ortalama gebelik haftası 28,8 ($\pm 2,7$) olan gebelerin vajinal örneklerinde PCR ile *U. urealyticum* %14 (5/36), *M. hominis* %28 (10/36) ve *M. genitalium* %0 olarak bildirirken ve pozitif bulunan kadınların doğumdaki gestasyonal yaşı ve bebeklerinin doğum ağırlığı anlamlı derecede, mikoplazma ve/veya ureaplazma negatif kadınlara göre daha düşük bulunmuştur.

Nasution et al. (78) Malezya'da 2007'de multiplex PCR ile yaptıkları çalışmalarında erken membran rüptürü olan gebelerde yaptıkları çalışmalarında % 22,5 *U. urealyticum*, % 10 *M. hominis* olarak bildirmişlerdir.

Luki et al. (79) Kanada'da 1998'de PCR ile yaptıkları çalışmalarında 47 peripartum yüksek riskli gebe kadının vajinal ve sekiz yenidoğandan aldıkları örneklerde % 56.4 *U. urealyticum* ve % 12.7 *M. hominis* olarak bildirmişlerdir.

Mirnejad et al. (80) İran'da 2011'de gebe ve gebe olmayan toplam 210 kadından aldıkları genital sürüntü örneklerinde PCR-RFLP ile yaptıkları çalışmalarında *M. genitalium* % 5.2 ve *U. urealyticum* % 44.3 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda PCR ile 24 hastada (% 39.3) *M. hominis*, 19 hastada (% 31.1) *U. urealyticum*, kontrol grubundaki 3 gebede (% 14.3) her iki mikroorganizma tespit edilmiştir. *M. hominis* PCR sonuçlarımız Serin ve ark. (69)'nın sonuçları ile uyumlu iken, Allen-Daniels et al. (6), Nguyen et al. (76), Paramel Jayaprakash et al. (77), Nasution et al. (78) ve Luki et al. (79) sonuçlarından yüksektir. *U. urealyticum* PCR sonuçlarımız Gerber et al. (75), Paramel Jayaprakash et al. (77) ve Nasution et al. (78) sonuçlarından yüksek iken, Luki et al. (79), Mirnejad et al. (80) sonuçlarından düşüktür.

Birçok araştırmacı (2-4,18,28,29,32,35,74) *M. hominis* ve ureaplazma için kültür tekniklerinin halen çok değerli olduğunu, ancak daha duyarlı olan PCR gibi moleküler tabanlı tekniklerin, tanı için gerekli olabileceğini ve çoğu insan kaynaklı ureaplazmal türlerin yanı sıra çoğu mikoplazmal türe de uygun olduğunu bildirmişlerdir. Moleküler tekniklerin artan kullanımı, doğum komplikasyonları olan hastalar arasında mikoplazmal enfeksiyonun tespit edilmesini artırdığını bildirmişlerdir.

Mikoplazma ve ureaplazma için bazı araştırmacılar kültür oranlarını PCR'dan daha yüksek bildirirken bazı araştırmacılar da PCR sonuçlarını kültür sonuçlarından daha yüksek oranlarda bildirilmiştir (74,81-83).

Naher ve Said (74) Irak'ta 2013'de yaptıkları çalışmada; arginin agar ve A7 agar kültür yöntemi ile 352 vakada *U. urealyticum* ve 91 vakada *M. hominis* pozitif bulmuşlardır. Bu izolatlardan PCR araştırması için 90 *U. urealyticum* ve 60 *M. hominis* izolatu seçmişlerdir. Bunlar arasında *U. urealyticum* izolatlarının PCR yöntemi ile (65/90) %72.2'sinin pozitif (25/90) %27.8'inin negatif olduğunu, *M. hominis* için yalnızca (37/60) %61.7'sinin PCR ile pozitif, buna karşın (23/60) %38.3'ünün negatif sonuç verdiğini bildirmişler ve buna göre, kültür için pozitif olan izolatların hepsinin de PCR için pozitif olabileceği sonucuna varılamayacağını, bu sonuçların belirgin bir şekilde, mikoplazmaların tanısı için kültür yöntemlerinin hâlâ gizli altın yöntemler olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yoon et al. (81) 2003'de yaptıkları çalışmalarında; 257 preterm doğum ve sağlam membran hastasında amniyosentez uygulanan bir çalışmada; 15 olguda PCR ile *U. urealyticum* pozitif bulurken, 9 olguda ise kültür pozitif bulduklarını ve PCR ile tespit ettikleri 6 olgunun kültürde üremediğini bildirmişlerdir.

Xiao et al. (82) Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2010'da yaptıkları çalışmalarında; kültürde üretilen 32/132 (%24,2) örneğe karşı, PCR yöntemi ile 132 örnekten 52'sinde (%39,4) ureaplazma DNA'sını tespit ettiğini bildirmişlerdir. Kültür, referans metot olarak düşünülse de, PCR'ın teorik olarak daha az organizmayı tespit edebildiğini ve bu nedenle, PCR pozitif, kültür negatif örnekler muhtemelen gerçek pozitifleri temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Choi et al. (83) Kore'de 2012'de yaptığı çalışmada; komplikasyonu bulunan gebelerin vajinal sürüntü örneklerinden *Mycoplasma* IST-2 kiti ve A7 *Mycoplasma* agar ile PCR yöntemini kullanmışlardır. *M. hominis*'in PCR ile tespit oranını, kültür yöntemine göre daha yüksek (%11.1'e karşı %4.0,) bulurken, *U. urealyticum*'da PCR ve kültür yöntemi ile tespit oranlarını sırasıyla %16.7 ve %57.1 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda önceki araştırmacılardan Choi et al. (83)'e benzer şekilde *M. hominis* PCR (% 39.3) sonucumuzu kültürden (% 9.8) daha yüksek bulurken, buna karşılık Naher ve Said (74) kültür sonucunu PCR'dan daha yüksek bildirmişlerdir. *M. hominis*'e olduğu gibi Yoon et al. (81) ve Xiao et al. (82)'e benzer şekilde *U.*

urealyticum için PCR (% 31.1) sonucumuz kültürden (% 8.2) daha yüksek oranda iken, buna karşılık Naher ve Said (74) ve Choi et al. (83) kültür sonucunu PCR'dan daha yüksek bildirmişlerdir.

Gebelerde enfeksiyonunun spontan preterm doğumla ilişkili olduğu bildirilen diğer bir mikoplazma türü ise *M. genitalium*'dur (24,26). Gebelerden alınan serviko-vajinal örneklerde değişik oranlarda *M. genitalium* PCR pozitiflikleri bildirilmiştir. Hitti et al. (24) %3, Choi et al. (83) % 0, Paramel Jayaprakash et al. (77) %0, Oakeshott et al. (84) % 0.7, Peuchant et al. (85) % 0.8 ve Haghighi Hasanabad et al. (86) % 1.02 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki hasta grubunda *M. genitalium* PCR pozitifliği diğer çalışmalardan genel olarak yüksek oranda % 4,9 olarak bulunmuştur. Ancak Luki et al. (79) % 3.6'lık ve Mirnejad et al. (80) % 5.2'lik sonuçları ile uyumludur. Bu durum gebelerin farklı demografik özelliklerinin yanında bizim hasta grubumuzun belirgin semptomatik klinik bulgulara sahip olmalarından dolayı yüksek çıkmış olabilir. Nitekim Ashshi et al. (87) ektopik gebeliklerde *M. genitalium*'u % 20.2 olarak bildirmişlerdir. Bu organizmaların PCR sonuçlarının farklı olması; hastaların demografik özelliklerinin yanısıra, DNA'nın işlenmesi yoluyla bakteriyel DNA'da bozulmaya, intergenik spacer bölgelerin heterojenliğine, test edilen örnekte PCR reaksiyonunda bazı inhibitörlerinin varlığına, kromozomların yeniden düzenlenmesine veya mikoplazma ve/veya ureaplazma DNA miktarının PCR ile tespit edilebilir seviyenin altında olmasından dolayı olabilir.

M. hominis, *M. genitalium* ve *U. urealyticum*'un hasta ve kontrol grubundaki PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamakla beraber (sırası ile; p= 0.066, p= 0.598, p= 0.266) gerek hasta grubunda ve gerekse kontrol grubundaki gebelerde bu etkenlerin yüksek oranda tespit edilmesi klinik olarak önemlidir.

Mikoplazma ve ureaplazma dışında gebelik komplikasyonlarına en sık sebep olan *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* genital kolonizasyon insidansını tespit etmek için, hastalara ait vajinal ve endoservikal sürüntü ve ilk akım idrar örneklerinde in-House PCR yöntemi ile araştırdık.

CDC ilk prenatal muayenede gebelerin *C. trachomatis* yönünden taranmasını önermektedir. *N. gonorrhoeae* içinde yüksek riskli popülasyonda veya prevelansın yüksek olduğu bölgelerdeki gebelerde tarama önermektedir. Kadın yaşının ≤ 25 olması

yüksek risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Erken yaşta cinsel ilişki, yeni veya birden fazla seks partneri, düşük sosyoekonomik durum, korunmasız cinsel ilişki, tutarsız prezervatif kullanımı, ticari seks işi ve uyuşturucu kullanımı diğer risk faktörleridir. CDC, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* için ilk trimestirde pozitif olanlarda 3-6 ay sonra (yaklaşık üçüncü trimestir) tekrar kontrol testi yapılmasını önermektedir. *C. trachomatis* pozitif olanlarda tedaviden 3 hafta sonra tekrar kontrol test yapılmasını önermekte; komplikasyonsuz *N. gonorrhoeae* tanısı konulanlar için tedavi sonrası kontrol testine gerek olmadığını bildirmektedir. Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Birliği (ACOG), ≤ 25 yaşındaki gebe kadınlar ile yüksek riskli gruplarda tarama testini önermektedir. ACOG'da gebe kadınlara üçüncü trimesterde tekrar tarama testinin yapılmasını önermektedir (38,88).

Özüberk ve Gökahmetoğlu (89) Kayseri'de 2013'de yaptıkları çalışmalarında; genital akıntı ön tanısıyla başvuran ve genital enfeksiyon düşünülen 50 hastadan alınan sürüntü 1'inde (%2) iki PCR yöntemi ile *C. trachomatis* DNA pozitif bulmuşlardır.

Taskin ve Alpay (90) Balıkesir'de 2015'de yaptıkları çalışmalarında; üçüncü trimestirde olan 42 kadın hastanın servikovajinal akıntısından *C. trachomatis* veya *N. gonorrhoeae* için PCR yöntemi kullanmış ve tüm hastaları negatif bulmuşlardır.

Yaltı ve ark. (91) 2015'de yaptıkları çalışmalarında; gebelerde ve preterm doğum yapan hastalarda *C. trachomatis* prevalansını PCR ile sırasıyla % 1.2 ve % 3.6 olarak bulmuşlar ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PCR pozitif vakaların her iki grupta olmasının klinik açıdan önemli bir bulgu olduğunu bildirmişlerdir.

Choi et al. (83) Kore'de 2012'de yaptığı çalışmada; komplikasyonu bulunan gebelerin vajinal sürüntü örneklerinden PCR ile *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* oranlarını sırasıyla % 2,4 ve % 0 olarak bildirmişlerdir.

Nasution et al. (78) Malezya'da 2007'de multiplex PCR ile yaptıkları çalışmalarında erken membran rüptürü olan gebelerde yaptıkları çalışmalarında *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* tespit etmediklerini bildirmişlerdir.

Peuchant et al. (85) 2015'de yaptığı çalışmada; *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* oranları sırasıyla % 2,5 ve % 0 olarak bildirmişler ve 18-24 yaş gebeler ile partner sayısı beş ve üzerinde olanlarda *C. trachomatis* pozitifliğinin arttığını göstermişlerdir.

Haghighi Hasanabad et al. (86) İran'da 2011'de gebelerin idrar örneklerinde PCR ile yaptıkları çalışmalarında % 13.77 oranında *C. trachomatis* pozitifliği ve preterm doğum ile enfeksiyon arasında anlamlı korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir.

Apea-Kubi et al. (92) Gana'da 2004'de yaptıkları çalışmalarında; semptomlu 261 gebenin endoservikal örneklerinde PCR yöntemi ile % 3.4 *C. trachomatis* ve % 0.4 oranında *N. gonorrhoeae* bildirmişlerdir.

Chen et al. (93) Çin'de 2006'da yaptıkları çalışmalarında; 504 gebeden aldıkları servikal sürüntülerden PCR ile yaptıkları çalışmada *C. trachomatis* % 10,1 ve *N. gonorrhoeae* % 0,8 olarak bildirmişlerdir.

Jalil et al. (94) Brezilya'da 2008'de yaptıkları çalışmalarında; yaş ortalaması 23.8 olan (± 6.9) 3003 gebe de yaptıkları araştırmada. Klamidya ve gonokokun enfeksiyon prevalansını sırasıyla % 9.4 ve % 1.5 olarak bildirmişlerdir. Klamidyalı hamile kadınların % 10'unda aynı anda gonokok olduğunu ve bu enfeksiyonlardan birini taşıma riski, 20 yaş altı gebe kadınlarda iki kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Berggren and Patchen (95) Amerika'da 2011'de yaptıkları çalışmalarında; genç gebelerin % 31'inde gebelik sırasında *C. trachomatis* veya *N. gonorrhoeae* enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Birden fazla tarama testine sahip olan hastaların % 75'inin (95/125), % 11'inde (10/95) tekrar enfeksiyon olduğunu ve % 7'sinde (7/95) tekrar testinde yeni bir enfeksiyon bildirmişlerdir. Tekrarlayan *C. trachomatis* % 9'unda (9/95) olduğunu ve % 4'ünde (4/95) ise tarama testinde yeni tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Tekrarlayan *N. gonorrhoeae* % 3'ünde (3/95) ve % 4'ünde (4/95) ise tarama testinde yeni tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Ghope et al. (96) Hindistan'da 2014'de bir poster çalışmalarında gebe adölesan grupta PCR ile *C. trachomatis* % 0,43 ve *N. gonorrhoeae* % 4,31 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda PCR yöntemi ile *C. trachomatis* 10 hastada (% 16.4) ve kontrol grubunda 8 kişide (% 38.0) tespit ettik. Hasta ve kontrol grubundaki *C. trachomatis* PCR sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark anlamlı ($p=0.064$) bulunmama ile beraber gebelerde yüksek oranlarda tespit edilmiş olması klinik açıdan da dikkat edilmesi gereken bir durumdur. *C. trachomatis* PCR sonuçlarımız; Haghighi Hasanabad et al. (86), Chen et al. (93), Jalil et al. (94) ve Berggren and Patchen (95) sonuçlarına yakın iken, Özüberk ve Gökahmetoğlu (89), Taskin ve Alpay (90), Yaltı ve ark. (91), Choi et al. (83), Nasution et al. (78), Peuchant et al. (85), Apea-Kubi et al.

(86) ve Ghope et al. (96) sonuçlarından yüksektir. Bizim sonuçlarımız ve diğer araştırma grupları arasındaki farklı sonuçların ortaya çıkması CDC tarafından ≤ 25 yaştaki gebe popülasyonunun yüksek riskli grup olarak görülmesi ve buna uygun olarakta bizim hastalarımızın çoğunluğunun 18-30 yaş grubunda olması, semptomatik belirtilere sahip olmaları ve diğer risk faktörlerine bağlı olabilir. Bununla birlikte, *N. gonorrhoeae*'yi PCR ile tespit etmemiş olmamızla birlikte diğer araştırmacılardan Taskin ve Alpay (90), Choi et al. (83), Nasution et al. (78), Peuchant et al. (85) da tespit etmediklerini bildirirken, Apea-Kubi et al. (92), Chen et al. (93), Jalil et al. (94), Berggren and Patchen (95) ve Ghope et al. (96) oldukça düşük oranlarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bizim *N. gonorrhoeae* PCR sonuçlarımız, diğer araştırma gruplarının sonuçları ile genel olarak uyumlu bulunmuştur.

Literatürde gebelik komplikasyonlarına en sık sebep olan mikoplazma, ureaplasma ve klamidyaların çoklu enfeksiyonlar yaptıkları da bildirilmiştir (17,64,80,86,97). Kültür yönteminde en fazla *M. hominis*+*U. urealyticum* birlikteliği bildirilirken, diğer türlerin birlikteliği değişkenlik göstermektedir. *M. hominis*+*U. urealyticum* birlikteliğini Bayraktar ve ark. (17) % 6, Bengisun ve ark. (71) % 21.61, Lee et al. (34) % 9.4 ve Kwak et al. (97) % 7.1 olarak bildirmişlerdir. Biz bu iki bakteri birlikteliğini kültür yöntemi ile hasta grubunda % 8.2 ve kontrol grubunda % 9.5 olarak tespit ettik. Sonuçlarımız Bengisun ve ark. (71) sonuçları dışında diğer araştırmacıların sonuçlarıyla genel olarak uyumludur. Bu durum hastaların çeşitli özelliklerine bağlı olabilir. Diğer bakteri birlikteliklerinden *M. genitalium*+*U. urealyticum* birlikteliğini Mirnejad et al. (80) % 1.9 ve *M. genitalium*+*C. trachomatis* birlikteliğini Haghighi Hasanabad et al. (86) % 1.02 olarak bildirmişlerdir. Bizim *M. genitalium*+*U. urealyticum* birlikteliğini diğer çalışmacıların sonuçlarıyla uyumlu olarak % 1,6 oranında tespit ettik. Diğer bakteri birliktelikleri sayı ve çeşitlilik olarak değişkenlik göstermekle beraber; sonuç olarak 24 hastamızda ve kontrol grubundaki üç gebede; en az bir hedef DNA dizisi tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Bu nedenle, gebelik komplikasyonlarına yol açan bu bakterilerin, azımsanmayacak kadar birlikte enfeksiyon yapabileceklerinin tanı ve tedavilerde göz önünde bulundurulmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Tang et al. (59)'ı referans alarak, *VspI* ve *HindIII* enzimlerini kullanarak erken membran rüptürüne neden olan majör mikoplazma türlerinin yüksek duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirlik ile tespit edilebileceğini gösterdik.

Allen-Daniels et al. (6) yaptığı çalışmada 58 gebenin 17'sinde *M. hominis*'i PCR yöntemi ile pozitif bulmuşlardır. Bu 58 gebenin 10'unda (37. haftadan önce) erken doğum görülmüş, bunların da 4'ü *M. hominis* yönünden pozitif bulunmuştur. Normal doğum yapan sağlıklı 48 gebenin ise 13'ünde *M. hominis* pozitif bulunmuş ve pozitiflik 16S rRNA'yı hedef alan kantitatif PCR yöntemi ile doğrulamışlardır. Çalışmalarında ilk defa *M. Hominis*'in ***arl***, ***goiB*** ve ***goiC*** hedef bölgelerini taşımasının etkisi araştırmışlar ve ***arl*** ile ***goiB*** istatistiki olarak preterm doğum ile ilişkili bulunmazken, özellikle ***goiC***'nin erken membran rüptürü görülen tüm gebelerde görüldüğünü ve istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamız da, ülkemizde bu genlerin araştırılması için ilk araştırma olması açısından önemlidir. Hasta grubundaki iki gebede *M. hominis*'in ***arl*** hedef bölgesini tespit ettik; bununla birlikte ***goiB*** veya ***goiC***'yi tespit etmedik. Kontrol grubundaki bir gebeden izole edilen *M. hominis*'te ***arl*** ve ***goiB*** pozitifliğini bulduk, ancak ***goiC*** hedef sekansı bulmadık. ***goiC***'nin daha önce erken membran rüptüründe istatistiksel olarak önemli bir rolü olduğu bildirilmesine rağmen, çalışmamızda bir etki oluşturmamıştır. Bunun nedeni, hasta nüfusunun etnik yapısı, cinsel alışkanlıkları ve tek eşlilik gibi farklı nedenlere bağlı olabilir. ***goiC*** hedef bölgesini tespit etmek ve bu genlerin etkilerini daha iyi açıklamak için daha fazla hasta popülasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Erken doğum şüphesi bulunan gebelerin amniyon sıvısı ve vajinal sürüntü örneklerinde *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. hyorhins*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* varlığının sorgulanması ve bu hastaların idrar örneklerinde *C. trachomatis* ve *N. gonorrhoeae* araştırılması ve izole edilen *M. hominis* suşlarında erken membran rüptüründen sorumlu olduğu düşünülen *arl*, *goiB* ve *goiC* hedef bölgelerinin tespiti ve bölgemizde ilk defa amniyona invazyonda etkili olarak erken doğuma neden olan bu virulans genlerinin araştırılması amacı ile planlanan bu çalışmada;

1. Çalışma grubumuzun büyük çoğunluğunu 18-30 yaş grubu hastaların oluşturduğu,
2. Hastalarımızın % 9.8'nin hem endoserviks hem de vajen sürüntü örneklerinden selektif katı besiyerinde *M. hominis* ve % 8.2 *U. urealyticum*'un birlikte üretildiği,
3. PCR yöntemi ile % 39.3 *M. hominis*, % 4.9 *M. genitalium* ve % 31.1 *U. urealyticum*, kontrol grubunda ise sırası ile; % 14.3, % 9.5 ve % 14.3 olarak tespit edildiği,
4. PCR yöntemi ile kültür yönteminden daha yüksek oranda pozitiflik tespit edildiği,
5. PCR yöntemi ile *C. trachomatis* % 16.4 ve kontrol grubunda % 38.0 tespit edildiği,
6. Hasta grubundaki 24 gebede ve kontrol grubundaki üç gebede; en az bir hedef DNA dizisi tespit edildiği ve bu nedenle, gebelik komplikasyonlarına yol açan bu bakterilerin, azımsanmayacak kadar birlikte enfeksiyon yapabileceklerinin tanı ve tedavilerde göz önünde bulundurulmasının faydalı olacağı,
7. Hasta grubundaki iki gebede *M. hominis*'in *arl*, kontrol grubundaki bir gebede *arl* ve *goiB* pozitifliği bulunduğu, ancak *goiC* hedef sekansının bulunmadığını, *goiC* geninin daha önce membran rüptüründe istatistiksel olarak önemli bir rolü olduğu bildirilmesine rağmen, çalışmamızda bir etki oluşturmadığını tespit ettik.

Bu sonuçlara dayanarak gebelerde erken membran rüptürü ve diğer komplikasyonlar için risk oluşturan bu mikroorganizmaların elimine edilmesi ve özellikle sebebi bilinmeyen düşüklerde doğru tanı ve tedavinin sağlanması için, gebelerde bu etkenlerin de rutin olarak taranması, mikoplazma, ureaplazma ve diğer genital enfeksiyon etkenlerindeki mutasyonlara bağlı virülans ve direnç değişimlerinin moleküler bazlı sürveyans yöntemleri ile araştırılmasının gerekli olduğu ve bu sebeple daha geniş ve farklı gebe grupları ile çalışmanın sürdürülmesinin gerek ülkemiz gerekse evrensel tip açısından önem arz ettiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG, Vijana Rao A, Mcnellis D, Regan JA, Carey JC, Klebanof MA, For The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *N Engl J Med*, **1995**; 333: 1737-1742.
2. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Chapter 11. *Neisseria* Species and *Moraxella catarrhalis*; Chapter 18. Mycoplasmas and Ureaplasmas. Chapter 23. Infections With *Chlamydia* and *Chlamydophila* Species. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 7th.ed. Lippincott Company New York. **2017**, 614-669;1172 -1218; 1571-1574.
3. Taylor-Robinson D, Lamond RF. Mycoplasmas in pregnancy. *BJOG*, **2011**; 118: 164-174.
4. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev*, **2005**; 18: 757-789.
5. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol*, **2004**; 4,35.
6. Allen-Daniels MJ, Serrano MG, Pflugner LP, Fettweis JM, Prestosa MA, Koparde VN, Brooks JP, Strauss JF, Romero R, Chaiworapongsa T, Eschenbach DA, Buck GA, Jefferson FF. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*, **2015**; 212: 779.e1-13.
7. WHO Fact sheet Updated August 2016. Sexually transmitted infections (STIs) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en>) **2016**. (Erişim Tarihi: 01.10.2017)
8. Patel AL, Sachdev D, Nagpal P, Chaudhry U, Sonkar SC, Mendiratta SL, Saluja D. Prevalence of Chlamydia infection among women visiting a gynaecology outpatient department: evaluation of an in-house PCR assay for detection of Chlamydia trachomatis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **2010**; 9: 24.
9. Fazlı řA. *Neisseria* ve *Branhamella*., Gerçeker, D. *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*., Özbai Y. Klamidyalar. In: Ustaçelebi ř, Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1.Öncü basımevi, Güneř kitabevi, **1999**; (4)372-386., (22); 595- 604., (33);705-714.
10. Eaton MD, Gordon Meiklejohn G, Herick WV. Studies on the Etiology of Primary Atypical Pneumonia. *J Exp Med*, **1944** Jun 1; 79(6): 649–668.
11. Clyde WA, Denny FW, Dingle JH. Fluorescentstainable antibodies to the Eaton agent in human primary atypical pneumonia transmission studies. *J Clin Invest*, **1961**; 40 (9): 1638 –1647.
12. Shepard MC, Lunceford CD. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J Clin Microbiol*, **1976**; 3(6): 613-625.
13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editör. Gram Negative Cocci: *Neisseria* and *Morexella catarrhalis*., Obligate Intracellular and Nonculturable Bacterial Agents., Cell Wall-Deficient Bacteria: Mycoplasma and Ureaplasma., *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*, 11th ed. St. Louis: Mosby, **2002**; (45); 501-509., (49); 572-586., (50); 587-594.

14. **Boesen T, Fedosova NU, Kjeldgaard M, Birkelund S, Christiansen G.** Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. *Protein Science*, **2001**;10: 2577-2586.
15. **Henrich B, Feldmann RC, Hadding U.** Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity*, **1993**; 61(7): 2945-2951.
16. **Boesen T, Emmersen J, Baczynska A, Birkelund S, Christiansen G.** The vaa locus of *Mycoplasma hominis* contains a divergent genetic islet encoding a putative membrane protein. *BMC Microbiol*, **2004** Sep 22; 4: 37.
17. **Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O.** Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int. J. Infect. Dis*, **2010**; 14: 90-95.
18. **Sleha R, Bostikova V, Salavec M, Bostik P, Slehova E, Kukla R, Mosio M, Vydrzalova M, Mazurova J.** Mycoplasma Infections In Humans. *Mil Med Sci Lett (Voj. Zdrav. Listy)*, **2013**; 82(4): 142-148.
19. **Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A.** *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis*, **2007**; 7: 129.
20. **Henao-Martínez AF, Young H, Nardi-Korver JJL, Burman W.** *Mycoplasma hominis* brain abscess presenting after a head trauma: a case report. *J Med Case Rep*, **2012**; 6: 253.
21. **Pascual A, Perez M-H, Jatón K, Hafen G, Di Bernardo S, Cotting J, Greub G, Vaudaux B.** *Mycoplasma hominis* necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. *BMC Infect Dis*, **2010**; 10: 335.
22. **Barykova YA, Logunov DY, Shmarov MM, Vinarov AZ, Fiev DN, Vinarova NA.** Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget*, **2011**; 2: 289-297.
23. **Baseman JB, Dallo SF, Tully JG, Rose DL.** Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol*, **1988**; 26: 2266-2269.
24. **Hitti J, Garcia P, Totten P, Paul K, Astete S, Holmes K.** Correlates of Cervical *Mycoplasma genitalium* and Risk of Preterm Birth Among Peruvian Women. *Sex Transm Dis*, **2010**; 37: 81-85.
25. **Lillis RA, Nsuami L, Myers D, Martin H.** Utility of Urine, Vaginal, Cervical, and Rectal Specimens for Detection of *Mycoplasma genitalium* in Women. *J Clin Microbiol*, **2011**; 49: 1990-1992.
26. **Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H.** 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections(https://www.iusti.org/regions/Europe/pdf/2016/IUSTI_mycoplasma_guidelines2016.pdf), **2016**; (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
27. **Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, Allan RW, Iczkowski KA, Urbanek C, Reyes L, Sakamoto N, Rosser CJ.** Persistent Exposure to *Mycoplasma* Induces Malignant Transformation of Human Prostate Cells. *PLoS ONE*, **2009**; 4(9): e6872.
28. **Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI.** Molecular Methods for the Detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* Infections in Humans. *JMD*, **2012**; 14(5): 437-450.
29. **Voorde JV, Balzarini J, Liekens S.** Mycoplasmas And Cancer: Focus On Nucleoside Metabolism. *EXCLI Journal*, **2014**; 13: 300-322.

30. **Viscardi RM.** *Ureaplasma* species: Role in Diseases of Prematurity. *Clin Perinatol*, **2010** June; 37(2): 393–409.
31. **Donders GG, Calsteren KV, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierdee S.** Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*, **2009**; 116: 1315–1324.
32. **Pöder A, Haldre M.** Urogenital Mycoplasmosis and Pregnancy. *J Antimicrob Agents* **2016**; 2: 4.
33. **Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM.** Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma species* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis*, **2014** Mar 28; 14: 171.
34. **Lee MY, Kim MH, Lee WI, Kang SY, Jeon YL.** Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women. *Yonsei Med J*, **2016** Sep; 57(5): 1271-1275.
35. **Passos MDL, Jayaram A, Witkin SS.** *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Preterm Labor. *DST-J bras Doenças Sex Transm*, **2011**; 23(3): 138-141.
36. **Öztoklu İ, Yücel A.** *Chlamydia trachomatis* Enfeksiyonları. *Ankara Medical Journal*, **2012**; 12(1): 32-36.
37. **Infertility Prevention Campaign.** Summary of a Review of the Literature: Programs to Promote *Chlamydia* Screening. Prepared for CDC. Academy for Educational Develop. **2007**. (<http://www.cdc.gov/std/HealthComm/ChlamydiaLitReview2008.pdf>) (Son Erişim Tarihi: 01.10.2017).
38. **Workowski KA, Berman S.** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Recomm Rep*, **2010**; (59)9(RR-12): 1-110.
39. **Toni D, Thomas HJ.** Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis*, **2010**; 201(2): 114-125.
40. **Srivastava P, Jha R, Bas S, Salhan S, Mittal A.** In Infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected site release higher levels of interferon gamma, interleukin 10, and tumor necrosis factor alpha, upon heat shock protein stimulation than fertile women. *Reprod Biol Endocrinol*, **2008**; 6: 20.
41. **Ghosh M, Choudhuri S, Ray RG, Bhattacharya B, Bhattacharya S.** Association of Genital *Chlamydia trachomatis* Infection with Female Infertility, Study in a Tertiary Care Hospital in Eastern India. *The Open Microbiology Journal*, **2015**; 9: 110-116.
42. **Adachi K, Nielsen-Saines K, Klausner JD.** *Chlamydia trachomatis* Infection in Pregnancy: The Global Challenge of Preventing Adverse Pregnancy and Infant Outcomes in Sub-Saharan Africa and Asia. *BioMed Research International*, 2016; ID 9315757; 21 pages.
43. **Mejuto P, Boga JA, Leiva PS.** *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant women: an important risk to maternal and infant health. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, **2017**; 02(01): 001-011.
44. **Darville T, Hiltke TJ.** Pathogenesis of Genital Tract Disease due to *Chlamydia trachomatis*. *J Infect Dis*, **2010** June 15; 201(2): 114–125.

45. **Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Pol BVD.** Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Recomm Rep*, March 14, **2014**; 63(2): 1-18.
46. **Black CM.** Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clin. Microbiol. Rev*, **1997**;10(1):160–184.
47. **Puolakkainen M.** Laboratory diagnosis of persistent human chlamydial infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 17 December **2013**: 3(99):1-8.
48. **Patel AL, Sachdev D, Nagpal P, Chaudhry U, Sonkar SC, Mendiratta SL, Saluja D.** Prevalence of *Chlamydia* infection among women visiting a gynaecology outpatient department: evaluation of an in-house PCR assay for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **2010**; 9: 24.
49. **WHO** Guidelines for the Treatment of *Chlamydia trachomatis*. *World Health Organization* **2016**; 1-43. (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246165/1/9789241549714-eng.pdf>) (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
50. **Meyer T.** Diagnostic Procedures to Detect *Chlamydia trachomatis* Infections. *MDPI Microorganisms*, 2016; 4: 25.
51. **Silva MJPM, Florêncio GLD, Gabiatti JRE, Amaral RL, Júnior JE, Gonçalves AKS.** Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: a meta-analysis study. *Braz J Infect Dis*, **2011**; 15(6): 533-539.
52. **Resmi Gazete.** Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete;02.04.2011–27893. (<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm>) (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
53. **Ng LK, Martin IE.** The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, **2005**; 16(1): 15-25.
54. **WHO** Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. *World Health Organization* **2016**; 1-50. (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246114/1/9789241549691-eng.pdf>) (Erişim Tarihi: 01.10.2017).
55. **Tapsall JW, Schultz TR, Limnios EA, Donovan B, Lum G, Mulhall BP.** Failure of azithromycin therapy in gonorrhoea and dis correlation with laboratory parameters. *Sex Transm Dis*, **1998**; 25: 505–508.
56. **Cadieux N, Lebel P, Brousseau R.** Use of a triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA. *Journal of General Microbiology*, **1993**; 139: 2431-2437.
57. **Jensen JS, Borre MB, Dohn B.** Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41(1): 261-266.
58. **Aaltonen R, Vahlberg T, Lehtonen L, Alanen A.** *Ureaplasma urealyticum*: no independent role in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Obstetricia et Gynecologica*, **2006**; 85: 1354-1359.
59. **Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R.** A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods*, **2000**; 39: 121-126.

60. **Ghosh A, Dhawan B, Chaudhry R, Vajpayee M, Sreenivas V.** Genital mycoplasma & *Chlamydia trachomatis* infections in treatment naïve HIV-1 infected adults. *Indian J Med Res*, **2011**; 134(6): 960-966.
61. **Farrell DJ.** Evaluation of Amplicor *Neisseria gonorrhoeae* PCR Using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. *J. Clin. Microbiol*, **1999**; 37(2): 386-390.
62. **Larsen B, Hwang J.** *Mycoplasma, Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol*. **2010**; 7 pages.
63. **Norwitz ER, Caughey AB.** Progesterone supplementation and the prevention of preterm birth. *Rev Obstet Gynecol*, **2011**; 4(2): 60-72.
64. **Vouga M, Greub G, Prod'hom G, Durussel C, Roth-Kleiner M, Vasilevsky S, Baud D.** Treatment of genital mycoplasma in colonized pregnant women in late pregnancy is associated with a lower rate of premature labour and neonatal complications. *Clin Microbiol Infect*, **2014**; 20: 1074–1079.
65. **Đogić LM, Lučić N, Mičić D, Omeragić F, Hodžić E, Fazlagić S, Kovač R, Pavlović N.** Correlation between cervical infection and preterm labor. *Med Glas (Zenica)*, **2017**; 14(1): 91-97.
66. **Agger WA, Siddiqui D, Lovrich SD, Callister SM, Borgert AJ, Merkitich KW, Mason TC, Baumgardner DJ, Burmester JK, Shukla SK, Welter JD, Stewart KS, Washburn MJ, Bailey HH.** Epidemiologic Factors and Urogenital Infections Associated With Preterm Birth in a Midwestern U.S. Population. *Obstet Gynecol*, **2014**; 124(5): 969–977.
67. **Maleki S, Motamedi H, Moosavian SM, Shahbaziyan N.** Frequency of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Females With Urogenital Infections and Habitual Abortion History in Ahvaz, Iran; Using Multiplex PCR. *Jundishapur J Microbiol*, **2013**; 6(6): e100882.
68. **Shokouhizadeh S, Köksal F, Yarkın F, Uluhan R, Evrücke C, Öztürk C, Taheri C.** Gebe Kadınların Genitoüriner Sistemlerinde *Mycoplasma* Ve B Grubu Streptokokların İnsidansı İle Gebeliğe Etkileri. *Mikrobiyol Bült*, **1992**; 20: 253-260.
69. **Serin MS, Evrücke C, Kibar F, Köksal F.** Comparison of PCR and Cultivation Methods to Determine the Incidence of Infections due to *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* in Women Genitourinary Tract. *Eastern Journal of Medicine*, **2001**; 6(2): 48-52.
70. **Kibar F, Yaman A, Toksöz L, Büyükçelik Ö, Turaç BA, Öksün E.** Genital akıntı yakınması olan kadınlarda bakteri ve mantar Kültürü, Affirm VPIII (*Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida*) ve *Mycoplasma/Ureaplasma* Test Sonuçları. Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. *Klimik*, 18 Kasım **2005**; P05- 34.
71. **Bengisun JS, Özenci H, Ünlü C.** Vajinal Akıntıdan *Mycoplasma* ve *Ureaplasma* İzalasyonu ve Antibakteriyellere Kaşı Duyarlılıklarının Saptanması. *Mikrobiol Bült*, **1996**; 30: 33-39.
72. **Wasiela M, Krzemiński Z, Hanke W, Kalinka J.** Association between genital mycoplasmas and risk of preterm delivery. *Med Wieku Rozwoj*, **2003**; 7(3 Suppl 1): 211-216.
73. **Kacerovský M, Pavlovský M, Tošner J.** Preterm Premature Rupture Of The Membranes And Genital Mycoplasmas. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)*, **2009**; 52(3): 117-120.
74. **Naher HS, Said IH.** Culturing and PCR Methods for Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Women with Genitourinary Tract Infections. *Int. Res. J. Medical Sci*, **2013**; 1(3): 25-29.

75. **Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS.** Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis*, **2003**; 187: 518-521.
76. **Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS.** *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation pregnancy outcome. *J Perinat Med*, **2004**; 32(4): 323-326.
77. **Paramel Jayaprakash T, Wagner EC, Schalkwyk JV, Albert AYK, Hill JE, Money DM, PPRM Study Group.** High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort Study. *PLoS ONE*, **2016**; 11(11): e0166794.
78. **Nasution TA, Cheong SF, Lim CT, Leong EWK, Ngeow YF.** Multiplex PCR for the detection of urogenital pathogens in mothers and newborns. *Malaysian J Pathol*, **2007**; 29(1): 19-24.
79. **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. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **1998** Apr; 17(4): 255-263.
80. **Mirnejad R, Amirmozafari N, Kazemi B.** Simultaneous and rapid differential diagnosis of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* based on a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Indian J Med Microbiol*, **2011**; 29: 33-36.
81. **Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, Jun JK.** The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, **2003**; 189: 919-924.
82. **Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, Waites KB.** Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, **2010**, 48: 2715-2723.
83. **Choi SJ, Park SD, Jang IH, Uh Y, Lee A.** The Prevalence of Vaginal Microorganisms in Pregnant Women with Preterm Labor and Preterm Birth. *Ann Lab Med*, **2012**; 32: 194-200.
84. **Oakeshott P, Hay P, Taylor-Robinson D, Hay S, Dohn B, Kerry S, Jensen JS.** Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and relationship between its presence and pregnancy outcome. *BJOG*, **2004**; 111(12): 1464-1467.
85. **Peuchant O, Le Roy C, Desveaux C, Paris A, Asselineau J, Maldonado C, Chêne G, Horovitz J, Dallay D, de Barbeyrac B, Bébér C.** Screening for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma genitalium* should it be integrated into routine pregnancy care in French young pregnant women? *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2015**; 82(1): 14-19.
86. **Haghighi Hasanabad M, Mohammadzadeh M, Bahador A, Fazel N, Rakhshani H, Majnooni A.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* in pregnant women of Sabzevar- Iran. *Iran J Microbiol*, **2011**; 3(3): 123-128.
87. **Ashshi AM, Batwa SA, Kutbi SY, Malibary FA, Batwa M, Refaat B.** Prevalence of 7 sexually transmitted organisms by multiplex real-time PCR in Fallopian tube specimens collected from Saudi women with and without ectopic pregnancy. *BMC Infectious Diseases*, **2015**; 15: 569.
88. **Keegan MB, Diedrich JT, Peipert JF.** *Chlamydia trachomatis* infection: Screening and Management. *J Clin Outcomes Manag*, **2014**; 21(1): 30-38.

89. **Özüberk O, Gökahmetoğlu S.** Klinik Örneklerde Moleküler Yöntemlerle *Chlamydia trachomatis* Araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 2013; 22(2): 121-126.
90. **Taskin MI, Alpay Y.** Screening of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with PCR During Pregnancy. *J Clin Anal Med*, **2015**; 6(suppl 5): 599-602.
91. **Yaltı E, Şahin Ersoy G, Tanır MH.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis* Infection in Pregnant Women with Preterm Labor, PROM and Abortion. *Firat Tıp Derg/Firat Med J*, **2015**; 20(3): 143-147.
92. **Apea-Kubi KA, Yamaguchi S, Sakyi B, Kisimoto T, Ofori-Adjei D, Hagiwara G.** *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Treponema pallidum* Infection in Antenatal and Gynecological Patients at Korle-Bu Teaching Hospital, Ghana. *Jpn J Infect Dis*, **2004**;57:253-256.
93. **Chen XS, Yin YP, Chen LP, Thuy NT, Zhang GY, Shi MQ, Hu LH, Yu YH.** Sexually transmitted infections among pregnant women attending an antenatal clinic in Fuzhou, China. *Sex Transm Dis*, **2006**; 33(5): 296-301.
94. **Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, Moherdaui F, Barbosa MJ.** Prevalence of *Chlamydia* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in pregnant women in six Brazilian cities. *Rev Bras Ginecol Obstet*, **2008**; 30(12): 614-619.
95. **Berggren EK, Patchen L.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* and repeat infection among pregnant urban adolescents. *Sex Transm Dis*, **2011** March; 38(3): 172-174.
96. **Ghope P, Sonkar SC, Wasnik K, Mittal P, Saluja D.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant adolescent women and its association with pregnancy outcomes. *BMC Infectious Diseases*, **2014**; 14(3): E33.
97. **Kwak DW, Hwang HS, Kwon JY, Park YW, Kim YH.** Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, **2014** Mar; 27(4): 333-337.

ÖZGEÇMİŞ

Adana'nın Feke İlçesi'nde 1974 tarihinde doğdu. İlköğretimini İki Haziran İlkokulu'nda, ortaokulu Ceyhan Pamukeli Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Ankara Keçiören Çevre Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başlayıp, 1998 yılında mezun oldu. 1998-2001 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji AD'da yüksek lisansını tamamladı. Askerliğini 2003 yılında bitirdi. Tıpta uzmanlık sınavında Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nü kazanıp, uzmanlık eğitimini 2008 yılında bitirdi. Şanlıurfa Balıklıgöl Devlet Hastanesi'ne Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanı olarak atandı. Adana Hıfzıssıhha Entitüsü Müdürlüğü'nde müdür vekili olarak 2008-2012 yıllarında görev yaptı. Adana Halk Sağlığı Laboratuvar sorumlusu olarak 2012-2013 yıllarında görev yaptı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda 2014 tarihinde doktora eğitimine başladı. Halen Adana Halk Sağlığı Laboratuvarında tıbbi mikrobiyoloji uzmanı olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve üç çocuk babasıdır.