

Miyokard İnfarktüsü Geçiren Hastalarda Chlamydia pneumoniae Antikorlarının Araştırılması

Ümran ÖZTÜRK YILMAZER (*), Ali AĞAÇFİDAN (*)

(* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Çalışmamızda, klinik olarak akut miyokard infarktüsü (AMI) geçirmiş olan 50 hastada Chlamydia pneumoniae'ye özgü IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar mikroimmünfloresan (MIF) yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışma grubunda yer alan 50 hastanın 40'ı erkek, 10'u kadın, kan donörlerinden oluşan kontrol grubundaki 24 sağlıklı kişinin ise 12'si kadın, 12'si erkektir. C.pneumoniae'ye özgü IgG tipi antikorlar 40 hastada pozitif bulunurken IgM tipi antikorlar dört hastada pozitif olarak saptanmıştır. IgA tipi antikorlar ise sadece iki hastada pozitif belirlenmiştir. Pozitif bulunan 40 hastanın C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorlarının sulandırımalarında, 11'inde 1/64, 10'unda 1/128, dokuzunda 1/256, üçünde 1/512, üçünde 1/1024, dördünde 1/2048 oranlarında pozitiflik saptanmıştır. IgM pozitifliği (1/32) bulunan dört hastanın, IgA pozitifliği (1/32) bulunan iki hastanın C.pneumoniae'ye özgü antikorlarının diğer sulandırımalarında ise pozitiflik saptanmamıştır. Kontrol grubundaki sağlıklı kişilerde ise C.pneumoniae'ye özgü IgA ve IgM tipi antikorlarda pozitiflik saptanmamış, buna karşılık IgG tipi antikorlar 11 kişide pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan 11 donörün C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorlarının sulandırımalarında, birinde 1/64, sekizinde 1/128, birinde 1/256, birinde 1/512 oranlarında pozitiflik saptanmıştır.

C.pneumoniae'ye özgü IgG, IgM ve IgA tipi antikorların çalışma grubundaki hastalarla, kontrol grubundaki sağlıklı kişiler karşılaştırıldığında AMI geçirmiş hastalarda sadece IgG tipi antikorların anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p:0,006).

Çalışmamızın sonucu, şimdiye kadar konu ile ilgili yapılmış araştırmalarla uyumlu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Akut miyokard infarktüsü, C.pneumoniae, mikroimmünfloresan

SUMMARY

Investigation of Chlamydia pneumoniae Antibodies in Patients with Acute Myocardium Infarction

In our study, Chlamydia pneumoniae specific IgM, IgG and IgA antibodies were investigated in 50 patients who are clinically diagnosed as having acute myocardium infarction (AMI) by using Microimmunofluorescence (MIF) technique.

Test group of 50 patients was including 10 females and 40 males. Control group from blood donors was formed from 24 healthy volunteers who were 12 females and 12 males. 40 patients were seropositive in terms of IgG antibodies to Chlamydia pneumoniae whereas 4 patients and 2 patients were found to be IgM and IgA seropositive, respectively.

IgG titers of 40 seropositive patients showed those seropositivity ratios: 1/64 in 11 patients, 1/128 in 10 patients, 1/256 in 9 patients, 1/512 in 3 patients, 1/1024 in 3 patients and 1/2048 in 4 patients. In contrast, no positivity was detected in other dilutions of Chlamydia pneumoniae antibodies except of 4 patients with IgM seropositivity (1/32) and 2 patients with IgA seropositivity (1/32).

Healthy volunteers in control group were not seropositive with regard to Chlamydia pneumoniae specific IgM and IgA antibodies although 11 volunteers were found to be IgG positive, whose IgG antibody titers seropositivity ratios were 1/64, 1/128, 1/256 and 1/512 in 1, 8, 1 and 1 volunteers, respectively.

When IgA, IgM and IgG antibodies to Chlamydia pneumoniae in study group were compared to those from the healthy individuals, it was seen that only IgG antibodies were significantly higher in AMI patients (p:0,006), being in concordance with other related studies carried out so far.

Keywords: Acute myocardium infarction, C.pneumoniae, Microimmunofluorescence

GİRİŞ

Chlamydiaceae ailesinde bulunan mikroorganizmalar zorunlu hücre içi bakterilerdir (1). Gram negatif bakteri benzeri hücre duvarı içerirler. Nükleik asit yapılarında hem DNA, hem de RNA mevcuttur.

Son yıllarda 16S ve 23S rRNA gen sekanslama analiz çalışmaları ışığında yeni sınıflandırma tanımlanmıştır. Chlamydiales sırasıyla dört aileye ayrılmaktadır. 1) Chlamydiaceae: Bu ailede 2 cins bulunur. a) Chlamydia (*C.trachomatis*, *C.Muridarum*, *C.suis*) b) Chlamydothila (*C.pneumoniae*, *C.pecorum*, *C.psittaci*, *C.abortus*, *C.caviae*, *C.felis*) 2) Simkaniaceae: Bu ailede Simkania negevensis bulunur. 3) Parachlamydiaceae: Bu ailede Parachlamydia acanthamoeba (BN9 suşu) 4) İsimlendirilmemiş aile: Bu da Waddlia WSU 86-1044 suşunu içerir (2).

Chlamydia pneumoniae olarak adlandırılan türün önceleri Chlamydia psittaci'nin bir varyantı olduğu düşünülmüş ve ayrılan suşun adından dolayı "TWAR suşu" olarak adlandırılması önerilmiştir (3,4,5). *C. pneumoniae* üst ve alt solunum yolu infeksiyonlarına neden olmanın yanı sıra, son yıllarda yapılan seroepidemiolojik araştırmalarda iskemik kalp hastalığı, akut miyokard infarktüsü ve kronik koroner kalp hastalığı olan kişilerde *C.pneumoniae* IgG titresinin kontrollere göre daha yüksek bulunması, kronik *C.pneumoniae* infeksiyonunun kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde de rol oynadığını düşündürmektedir (6).

Bu ilişki ile ilgili ilk saptama Finlandiya'da olmuştur. Saikku ve ark. (7) kronik koroner kalp hastalığı ve akut miyokard infarktüsü olan hastalarda *C.pneumoniae*'ye karşı IgG ve IgA antikor titrelerini kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsünde akut miyokard infarktüsü tanısı konmuş hastalardan alınan kan örneklerinde mikroimmünofluoresan (MIF) yöntemi kullanarak *C.pneumoniae*'ye karşı oluşmuş spesifik IgM, IgG ve IgA tipi antikorların saptanması ve bakterinin varlığıyla akut miyokard infarktüsü ile ilişkisinin olup olmadığının orta-

ya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü 'nde akut miyokard infarktüsü tanısı konmuş 50 hasta çalışmaya alınmıştır. Kontrol grubu olarak aynı tarihlerde kan vermek üzere İstanbul Çapa Kızılay Kan Merkezine başvuran 24 sağlıklı kişi çalışmaya alınmıştır. Çalışma grubundaki her hastadan 8-10 ml heparinsiz kan alınmıştır. Bunlar laboratuvarında santrifüj edilip, ayrılan serumlar eppendorf tüplerine konularak, deneyin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de dondurulmuştur.

Tüm hasta serumlarında *C.pneumoniae*'ye karşı IgG, IgA, IgM tipi antikorların varlığı, MIF yöntemiyle Chlamydia IgG, IgA, IgM (Orgenium Laboratories, Finland) kiti kullanılarak araştırılmıştır.

Deneyin Temel Prensipleri

MIF testi *C.pneumoniae*'ye karşı insan serum örneğinde oluşan antikorları saptayan yarı kantitatif tek yöntemdir.

C.pneumoniae'nin saflaştırılmış elementer cisimciği (EC) antijen olarak kullanılmıştır. Bu antijenler lam üzerindeki kuyucuklar üstüne fikse edilmiştir. Sulandırılmış hasta serumları her bir sırada bulunan antijenler üzerine ayrı ayrı konmaktadır. İnkübasyonunu takiben lam yıkanır ve bağlı olmayan serum komponentleri uzaklaştırılır.

İkinci adımda fluoresein konjuge (anti-human IgG, anti-human IgA, anti-human IgM) her bir kuyucuğa damlatılır. Tekrar inkübe edilip, yıkanır. Lam kuruduktan sonra fluoresean mikroskopunda incelenir. Pozitif reaksiyonda koyu bir zeminde EC'ler elma yeşili parlaklığında görülür. Yarı kantitatif saptama için serumun tek dilüsyonu yeterlidir.

Serumların Toplanması

Her bir hastaya ait serum örneği, gruplar halinde çalışılmak üzere -20 oC'de saklanmıştır. Hemolitik veya lipemik serumlar test sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği için çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır.

Serumların Deney İçin Hazırlanması

Sulandırma plağının ilk çukurcuğuna serum sulandırma solüsyonundan 70 µl daha sonraki çukurcuklara 50 µl konmuştur. Hasta serumlarından 10 µL alınarak ilk çukurcuğa konmuştur. Bu çukurcukta 1/8 oranında sulandırma elde edilmiştir. Bu çukurcuktan daha sonraki çukurcuklara 50 µl aktarılmış ve böylece 1/16, 1/32 lik sulandırmalar elde edilmiştir. Aynı işlem negatif ve pozitif kontroller için de uygulanmıştır. Önce, yapılan bu sulandırmalarla çalışılmış, daha sonra pozitif çıkan sonuçların 1/2048 e kadar olan sulandırmaları yapıp IgM, IgA ve IgG sınıfı antikorların hangi sulandırmalarda pozitif olduğu saptanmıştır.

Deneyin Yapılışı

1. Lamlar, solüsyonlar ve hasta serumları deneye başlamadan önce oda ısısına getirilmiştir.
2. Fosfat tamponlu su (PBS): 1 l distile su içerisinde çözündürülerek (pH 7.2) hazırlanmıştır.
3. Pozitif, negatif, kontrol ve sulandırılmış hasta serumlarından 15 µl lam üzerindeki kuyucuklara pipetle konmuştur.
4. Lam 37 ± 1 °C'de nemli ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi IgG tipi antikorları tayin etmek için 30 dakika, IgM ve IgA tipi antikorları tayin için ise 180 dakika olarak belirlenmiştir.
5. İnkübasyon sonunda lam yıkılarak havada kurumaya bırakılmıştır.
6. Kurumuş olan lamdaki her bir kuyucuğa FITC konjugeden 15 µl pipetlenmiştir.
7. 30 dakikalık ikinci ve son inkübasyon için lamlar 37 °C'ye kaldırılmıştır.
8. İnkübasyon sonunda yıkama ve kurutma işlemleri tekrarlanmıştır.
9. Kuruyan lamların üzerine 3 damla örtücü sıvı (mounting medium) konup, lamelle kapatılmıştır.

Sonuçlar fluoresan mikroskopunda 400x veya 1000x büyütmede incelenmiştir. En iyi sonucu alabilmek için mikroskopik inceleme aynı gün yapılmıştır. Aynı gün incelemenin mümkün olmadığı durumlarda, hazırlanan lamların karanlıkta ve 2-8 °C'de tutulmak suretiyle üç güne kadar incelenebileceği bildirilmektedir.

Sonuçların Yorumlanması

Pozitif sonuç: Parlak elma yeşili renkte fluoresan veren EC'lerin görülmesi.

Düşük titrede pozitif sonuç: Sönük fluoresan veren EC'lerin görülmesi (Sınır değeri).

Negatif sonuç: Fluoresan yok. Belirgin Chlamydia morfolojisi görülmemesi.

İstatistik Analiz

İstatistik değerlendirmeler EPISTAT bilgisayar programı yardımıyla χ^2 ve yüzde oran kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışma 10'u kadın (%20), 40'ı erkek (%80) olmak üzere 50 hasta üzerinde yapılmıştır. Kontrol grubu olarak da 12'si kadın (%50), 12'si erkek (%50) olmak üzere 24 donör alınmıştır.

Çalışmaya alınan 40 erkek hastanın dördünde (%10) IgM pozitifliği, 32'sinde (%80) IgG pozitifliği ikisinde (%5) IgA pozitifliği saptanmıştır. 10 kadın hastanın ise sekizinde (%80) IgG pozitifliği saptanmış, IgM ve IgA pozitifliği ise saptanmamıştır (Tablo 1).

Çalışmaya alınan 12 erkek donörün (%50) altısında (%50) IgG pozitifliği saptanmış, IgM ve IgA pozitifliği ise saptanmamıştır. 12 kadın donörün (%50) beşinde (%41,6) IgG pozitifliği saptanmış, IgM ve IgA

Tablo 1. Hasta grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgA, IgM, IgG antikorları dağılımı ve yüzde oranları

Hasta Sayısı	Cinsiyet	IgM	IgG	IgA
40	Erkek (%80)	4 (%10)	32 (%80)	2 (%5)
10	Kadın (%20)	0	8 (%80)	0

pozitifliği ise saptanmamıştır (Tablo 2).

Çalışmaya alınan 32 erkek hastanın altısında (%18,7) 1/64, dokuzunda (%28,1) 1/128, dokuzunda (%28,1) 1/256, ikisinde (%6,2) 1/512, üçünde (%9,3) 1/1024,

Tablo 2. Kontrol grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgA, IgM, IgG antikorları dağılımı ve yüzde oranları

Donör Sayısı	Cinsiyet	IgM	IgG	IgA
12	Erkek (%50)	0	6 (%50)	0
12	Kadın (%50)	0	5 (%41,6)	0

üçünde (%9,3) 1/2048 serum sulandırımalarında pozitiflik saptanmıştır. Sekiz kadın hastanın ise beşinde (%62,5) 1/64, birinde (%12,5) 1/128, birinde (%12,5) 1/512, birinde (%12,5) 1/2048 serum sulandırımalarında pozitiflik saptanmış, 1/256 ve 1/1024 serum sulandırımalarında pozitiflik saptanmamıştır (Tablo 3).

Çalışmaya alınan 6 erkek (%54,5) donörün birinde (%16,6) 1/64, üçünde (%50) 1/128, birinde (%16,6) 1/256, birinde (%16,6) 1/512 oranlarında pozitiflik

Tablo 3. Hasta grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorlarının sulandırılmaları ve yüzde oranları

Hasta Sayısı	Cinsiyet	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
32	Erkek (%80)	6 (%18,7)	9 (%28,1)	9 (%28,1)	2 (%6,2)	3 (%9,3)	3 (%9,3)
8	Kadın (%20)	5 (%62,5)	1 (%12,5)	0	1 (%12,5)	0	1 (%12,5)

saptanmıştır. 1/1024 ve 1/2048 oranlarında pozitiflik saptanmamıştır. Beş kadın (%45,4) donörün beşinde (%100) 1/128 oranında pozitiflik saptanmış, 1/64, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 oranlarında pozitiflik saptanmamıştır (Tablo 4).

Çalışmaya alınan 50 hastanın ikisinde (%4) IgA, dördünde (% 8) IgM, 40'ında(%80) IgG pozitifliği saptanmıştır. 48'inde (%96) IgA, 46'sında (%92) IgM, Tablo 4. Kontrol grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorlarının sulandırılmaları ve yüzde oranları

Donör Sayısı	Cinsiyet	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
6	Erkek (%54,5)	1 (%16,6)	3 (%50)	1 (%16,6)	1 (%16,6)	0	0
5	Kadın (%45,4)	0	5 (%100)	0	0	0	0

10'unda (%20) IgG pozitifliği saptanmamıştır (Tablo 5).

Çalışmaya alınan 24 donörün 11'inde (% 45,8) IgG pozitifliği saptanmıştır. 24'ünde (%100) IgA ve IgM, 13'ünde (% 54,1) IgG pozitifliği saptanmamıştır.

Tablo 5. Hasta grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgA, IgM ve IgG antikorları dağılımı ve yüzde oranları

	IgA	IgM	IgG
Pozitif	2 (%4)	4 (%8)	40 (%80)
Negatif	48 (%96)	46 (%92)	10 (%20)

Çalışmaya alınan 50 hastanın 2'sinde (% 4) IgA pozitifliği saptanmış , 48'inde (% 96) ise saptanmamıştır. Kontrol grubunda ise 24 donörde (% 100) IgA poziti-

Tablo 6. Kontrol grubunda C.pneumoniae'ye özgü IgA, IgM ve IgG antikorları dağılımı ve yüzde oranları

	IgA	IgM	IgG
Pozitif	0	0	11 (%45,8)
Negatif	24 (%100)	24 (%100)	13 (%54,1)

tifliği saptanmamıştır (Tablo 7)..

Çalışmaya alınan 50 hastanın 40'ında (%80) IgG pozitifliği saptanmış 10'unda (%20) ise saptanmamıştır.

Tablo 7. C.pneumoniae'ye özgü IgA antikorlarının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması ve yüzde oranları

	IgA(+)	IgA(-)
Hasta	2 (%4)	48 (%96)
Kontrol	0	24 (%100)

Kontrol grubunda ise 24 donörün 11'inde (%45,8) IgG pozitifliği saptanmış, 13'ünde (%54,1) IgG pozitifliği saptanmamıştır (Tablo 8).

Çalışmaya alınan 50 hastanın dördünde (% 8) IgM

Tablo 8. C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorlarının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması ve yüzde oranları

	IgG(+)	IgG(-)
Hasta	40 (%80)	10 (%20)
Kontrol	11 (% 45,8)	13 (%54,1)

pozitifliği saptanmış 46'sında (% 92) ise saptanmamıştır. Kontrol grubunda ise 24 donörün hepsinde (%100) IgM pozitifliği saptanmamıştır (Tablo 9).

Çalışmaya alınan 50 hastanın ikisinde (%4) IgA, dördünde (%8) IgM pozitifliği saptanmış, fakat yapılan Tablo 9. C.pneumoniae'ye özgü IgM antikorlarının hasta ve kontrol grubunda karşılaştırılması ve yüzde oranları

	IgM(+)	IgM(-)
Hasta	4 (% 8)	46 (% 92)
Kontrol	0	24 (% 100)

1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 ve 1/2048'lik oranlarındaki sulandırımalarında hem IgA hem de IgM pozitifliği saptanmamıştır.

Sonuç olarak C.pneumoniae'ye özgü IgA ve IgM antikorlarının dağılımı hasta ve kontrol grubu arasında

fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak IgG hasta gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gösterecek biçimde yüksek bulunmuştur ($p:0,006$, $t_2=7.31$, $sd=1$).

TARTIŞMA

C.pneumoniae yetişkinlerin %5-10'unda pnömoni, sinüzit, bronşit gibi respiratuvar infeksiyonlara neden olur. Bazı ülkelerde C.pneumoniae'ye karşı antikorlar araştırılmış ve yetişkinlerde %50 civarında olduğu saptanmıştır (8). Yaşlılarda bu oran %60'ı bulmaktadır (9). Akut respiratuvar infeksiyonlarda etiyolojik etken olarak bulunmakla birlikte, serolojik bulgular C.pneumoniae'nin koroner kalp hastalığı, miyokard infarktüsü ve sarkoidoz gibi diğer hastalıklarla da ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (10). C.pneumoniae infeksiyonlarının inkübasyon periyodu uzundur. Asemptomatik infeksiyon belki de semptomatik infeksiyona göre çok daha fazladır (11).

C.pneumoniae infeksiyonları Amerika Birleşik Devletleri'nde endemi, İskandinavya'da ise epidemik şeklinde seyretmektedir. Her 6-7 ayda bir artış göstermekte, ancak mevsimsel periyodisite göstermemektedir. Antikorların ileri yaşlardaki persistansı, reinfeksiyonların sık olduğunu göstermektedir.

Serter ve ark. (12) tarafından Helsinki Üniversitesi Viroloji Bölümü ile ortaklaşa yürütülen bir çalışmada Ege bölgesinde yaşayan 407 sağlıklı kişiden toplanan serumlarda C.pneumoniae antikorları MIF yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, anti-C.pneumoniae IgG antikorlarını erişkinlerde %65, IgM antikorlarını ise %2 oranında saptanmıştır. Bu sonuç C.pneumoniae infeksiyonunun Ege bölgesinde aktif olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada akut miyokard infarktüsü, kronik koroner arter hastalığı, KOAH (kronik obstrüktif akciğer hastalığı) ve/veya astım, atipik pnömonisi olan değişik hasta gruplarından alınan örneklerde anti-C.pneumoniae IgG pozitifliği, kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuştur.

Ülkemizde daha geniş kapsamlı seroepidemiolojik çalışmanın yapılması, infeksiyonun yaygınlığını göstermek açısından önemlidir.

Kronik koroner kalp hastalığında ateroskleroz için bilinen risk faktörleri (örneğin; sigara, hipertansiyon, hiperkolesterolemi gibi) hastalığın patogenezi tam olarak açıklayamamaktadır. Bu nedenle bilinen risk faktörleri dışında, başka nedenler araştırılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri de infeksiyondur. Epidemiyolojik çalışmalar ateroskleroz patogenezi infeksiyonun rolü olduğunu doğrulamakta olup, bakteriyel DNA ile viral yapılar aterosklerotik lezyonlarda tanımlanmaktadır (13).

C.pneumoniae ve koroner arter hastalığı arasındaki ilişki, günümüze kadar değişik araştırmacılar tarafından seroepidemiolojik bulgular, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (9,14,15).

Bu konu ile ilgili saptama Saikku ve ark. (7) tarafından yapılmıştır. Angiografisi yapılmış ve klinik olarak da kronik koroner kalp hastalığı (KKH) saptanmış 30 erkek hasta ile, akut miyokard infarktüsü (AMI) geçirmiş 40 erkek hastayı risk grubu olarak, kardiyak problemi olmayan rasgele seçilmiş 41 kişiyi ise kontrol grubu olarak almışlardır. C.pneumoniae'ye özgü antikorlar MIF yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçta AMI geçiren hastaların %68'inde ve KKH olanların %50'sinde IgG 1/128 ve/veya IgA 1/32 titrelerinde pozitif olarak saptamışlar, IgM antikorlarını ise çalışma grubundakilerden hiçbirinde saptamamışlardır. Bu verilere göre kronik C.pneumoniae infeksiyonunun KKH ve AMI'de risk faktörü olabileceğini belirlemişlerdir.

Aynı grup tarafından Helsinki Heart Study'de 5 yılı aşan süreyi kapsayan çok daha geniş kapsamlı bir çalışma daha yapılmış, 140 kronik koroner kalp hastasında miyokard infarktüsü veya ani ölümle sonuçlanmadan önce 3. ve 6. aylarda alınan serumlarda MIF yöntemi ile C.pneumoniae'ye özgü IgG, IgA antikorları ile lipopolisakkarit içeren immün kompleks araştırılmıştır. Bu çalışmada miyokard infarktüsünden önce 3. ve 6. aylardaki yüksek IgA antikor titrelerinin ve lipopolisakkarit içeren immün kompleks varlığının kronik C.pneumoniae infeksiyonunun göstergesi olduğu ve bu göstergenin de kronik koroner kalp hastalığının gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğu sonucuna varmışlardır. Buna karşın sade-

ce yüksek IgG titresinin risk faktörü gibi olmadığını fakat istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (15,16).

1991 ve 1992 yıllarında Thom ve ark. (17,18) tarafından yapılan iki çalışma da bu verileri doğrulamaktadır. İlk çalışmada koroner anjiyografi uyguladıkları 461 KKH'da C.pneumoniae IgG antikorları yüksek olanlarda koroner arterlerde lezyon sayısını daha fazla bulmuşlardır. Diğer çalışmada ise koroner anjiyografisi yapılmış en az bir koroner arterde lümen çapında %50 veya daha fazla daralma olduğu kanıtlanmış 171 hasta bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu grupta yapılan çalışma sonucunda da koroner arter hastalığının C.pneumoniae infeksiyonu ile ilişkisi doğrulanmış, ayrıca ilk çalışmada yapılmayan risk faktörlerinin C.pneumoniae infeksiyonu ile ilişkisi araştırılmıştır. Serum kolestorel düzeyi, hipertansiyon, diyabet, alkol kullanımı, yaş, cinsiyet, sosyal sınıf gibi faktörler ile C.pneumoniae antikor düzeyleri arasında ilişki saptanamamıştır.

Linnanmaki ve ark. (8) çalışmasında yine anjiyografik olarak kronik koroner kalp hastalığı olduğu doğrulanmış 46 hastanın % 41'inde ve kontrol grubunun %15'inde C.pneumoniae'ye özgü dolaşan immün kompleks saptamışlardır (p<0,01). Çalışmada her bir KKH ve kontrol grubunun aynı cins ve yaşta olması sağlanmıştır. C.pneumoniae'ye özgü IgM, IgG ve IgA antikorlarını MIF yöntemi ile saptamışlardır. KKH'nın sadece %35'inde IgG<32 olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu hastalarda C.pneumoniae'ye özgü dolaşan immün kompleksin olmadığı saptanmıştır. Akut infeksiyon göstergesi olan IgM antikorları ise hastaların hiçbirinde bulunamamıştır.

Koroner kalp hastalığının oluşumunda kronik C.pneumoniae infeksiyonunun yardımcı olabileceğine dair teoriler üretilmektedir. Bunlardan birinde alveoler makrofajlarda ve endotel hücrelerde C.pneumoniae'nin bulunduğunu ve Chlamydial bileşenlerin kronik akciğer infeksiyonunda antikorlar oluşmadan önce immün kompleks şeklinde kolaylıkla dolaşma geçebileceği ve damar duvarında depolanarak lokal inflamasyon ve prokoagülan değişimlerle ateroskleroz gelişimine yardımcı olabileceği ileri sürü-

lmüştür (8).

Leinonen ve ark. (19) yaptıkları çalışmada, akut miyokard infarktüsü geçirmiş olan 95 hasta ve 139 kişilik kontrol grubunun kan serumlarında C.pneumoniae'ye özgü IgG, IgA antikorları ve immün kompleksi araştırılmıştır. MIF yöntemi ile saptanan serum IgG ve IgA antikorları hasta grubunda kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuş, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Oysa kronik C.pneumoniae infeksiyonunun en iyi göstergesi olarak alınan C.pneumoniae'ye özgü immün kompleksler hastaların %58'inde bulunurken kontrol grubunda ise sadece %26 olarak saptanmıştır.

C.pneumoniae antikorlarının bulunma oranıyla, koroner arterlerde erken lezyonları olanlar ile ilerlemiş lezyonları olan kişiler arasında fark bulunmamıştır (10). Aksine erken lezyonları olanların düşük IgG titresine sahip oldukları saptanmıştır (p<0,001). Seronegatif olan kişilerdeki arteriyel lezyonlarda C.pneumoniae çok daha fazla bulunmuştur. Altı seronegatif kişinin beşinde C.pneumoniae gösterilmiştir. Bunun nedeni bilinmemektedir. Muhtemel bir açıklama şöyle yapılabilir: Bu kişilerdeki antikorlar immün komplekse bağlıdır (Saikku ve ark. tarafından da doğrulanmıştır) (16). MIF deneyinde bu nedenle saptanamamaktadırlar. Alternatif bir açıklama ise şöyledir: IgG antikorları belki koruyucudur. Yüksek IgG titresine infeksiyonun eradikasyonuna ya da supresyonuna yardımcı olmaktadır. Aynı çalışmada araştırmacılar immüno blot yaparak C.pneumoniae'nin 42 kDa ve 52 kDa'luk proteinlerinin reaktivitelerini, akut respiratuvar infeksiyonu olan hasta serumlarına göre, aterosklerozu olan, seropozitif kişilerin serumlarında daha sıklıkla gözlemlemişlerdir. Böylece C.pneumoniae'ye özgü 42 ve 52 kDa'luk proteinlere karşı oluşan antikorların, kronik C.pneumoniae infeksiyonu için önemli bir gösterge olduğu sonucuna varmışlardır. İlginç olarak bu proteinler sarkoidozlu hastalarda da çok sık olarak gösterilmiştir. Sarkoidozun kronik C.pneumoniae infeksiyonuna eşlik ettiği de bildirilmiştir. Akut respiratuvar infeksiyonu olan kişilerde ise 60 kDa'luk proteinler sıklıkla görülmüştür. 42 ve 52 kDa'luk proteinler ise nadiren tanımlanmıştır.

C.pneumoniae'nin ekstrakoronar ateroskleroz ile ilişkisine dair yapılan tek seroepidemiolojik çalışma asemptomatik karotid ateroskleroz üzerinedir (9). Daha önceki çalışmalarda hep semptomatik koroner kalp hastalarında C.pneumoniae araştırılmıştır. Bu çalışmada ise asemptomatik ateroskleroz ile C.pneumoniae arasındaki ilişkiyi incelemektedir. Ateroskleroz risk çalışmasına alınan (ARIC) 15800 hastada asemptomatik karotid aterosklerozu saptamak için karotis arterin rezolüsyon gücü yüksek B tipi ultrasonografik incelemesi yapılmıştır. Karotis arterinde duvar kalınlaşması olanlarda asemptomatik ateroskleroz olduğu kabul edilmiştir. Anti-C.pneumoniae IgM antikorları %1'den az saptanmıştır. IgG antikorları ise %73 olarak bulunmuştur. Böylece C.pneumoniae enfeksiyonu ile asemptomatik karotid ateroskleroz arasında güçlü bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir (14).

C.pneumoniae ile KKH arasındaki ilişki hem seroepidemiolojik olarak hem de aorta ve koroner arterlerdeki ateromatöz plaklarda organizmanın direkt saptanması ile doğrulanmıştır. Koroner arteriyel lezyonu olan, direkt koroner atektomi ile alınmış 38 taze doku örneğinde C.pneumoniae araştırılmıştır. Örneklerin 23'ü primer lezyonu olan, 15'i restenozu olan hastalardan alınmıştır. C.pneumoniae 38 örneğin 20'sinde PCR ve ICC boyama ile gösterildi. Organizmaya ait ultrastrüktürel yapılar elektron mikroskopu kullanılarak iki örnekte saptanmıştır. Bu örnekler aynı zamanda PCR ve ICC ile de pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak C.pneumoniae'i primer lezyonu olanlara göre, restenozu olan hasta grubunda çok daha sık bulmuşlardır (p=0,17). C.pneumoniae'ye özgü antikor titresi ile organizmanın bulunma sıklığı arasında ki ilişki ise saptanmamıştır (20).

C.pneumoniae'nin lezyon bölgesinde makrofajlar içinde olduğu hem in vivo, hem de deneysel çalışmalarla doğrulanmıştır. İlk çalışmada C.pneumoniae, kan monositlerinden kaynaklanan makrofajlarda, ikinci çalışmada akciğerlerdeki intersitisyel makrofajlarda ve peritoneal makrofajlarda bulunmuştur. Takip eden deneysel çalışmalar farelerde yapılmıştır (20). Sonuç olarak organizmanın monosit/makrofajlarının enfekte edileceği, sistemik yayılımın bu yolla

sağlanabileceği ve lezyonlu bölgede kronik enfeksiyon oluşturarak aterosklerozun gelişimine yardımcı olabileceğini saptamışlardır (20). Aynı hastalardan alınan uygun serumlarda C.pneumoniae'ye özgü IgG antikorları %72 oranında bulunmuştur. Bu oran yaşlı kişilerde yapılan populasyon çalışması sonuçlarına benzemektedir. Yüksek titreye göre karşılaştırıldığı zaman, düşük titre ile organizmanın bulunma sıklığı arasında fark bulunamamıştır. Aksine Güney Afrika'da koroner ateroskleroz plaklarında yapılan çalışmada C.pneumoniae antijen DNA'sı, yüksek IgG titresine karşın, düşük IgG titresine bulunanlarda çok daha fazla bulunmuştur (10).

Kawashima ve Kawada'nın çalışmasında (21) akut iskemik krizli 91 hastanın (53 erkek, 38 kadın, yaş ortalaması 73) serumlarında ELISA ile C.pneumoniae'ye karşı oluşturulan spesifik antikorlar araştırılmıştır. Bu araştırmacılar klinik tanısı konmuş hastaları kardiyak embolizmi olanlar (A grubu), aterotrombotik infarktüsülüler (E grubu) ve lakuner infarktüsülüler (L grubu) olarak üç gruba ayırmışlar, 79 hastada da karotid ultrason incelemesi yapmışlardır. Akut primer enfeksiyon, reenfeksiyon ve kronik aktif enfeksiyon dahil aktif enfeksiyonu IgG veya IgA indeksi ile belirlemişler ve bu indeksi 3.00 veya daha büyük bulmuşlar, oysa kronik inaktif enfeksiyon dahil inaktif enfeksiyon IgG ve IgA indeksine 3.00'dan küçük ile belirlemişlerdir. A grubunun IgG indekslerini E ve L grubundakilerden daha yüksek bulmuşlardır. Karotid plaklı yedi hastanın IgG indeksinin karotid plaksız 72 hastadan daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma akut aterotrombotik infarktüs ile kronik aktif C.pneumoniae enfeksiyonu arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Ülkemizde bu konu ile ilgili olarak Yılmaz ve ark. (22) yaptıkları çalışma ile 72 koroner kalp hastasının %40'ında C.pneumoniae IgG antikorlarını pozitif olarak tespit ederken, kontrol grubundaki sağlıklı 25 kişinin %12'sinde C.pneumoniae IgG antikor pozitifliği bulmuşlardır.

Maraha ve ark. (23) çalışmasında vasküler dokular da C.pneumoniae'yi saptamak için PCR ve ICC yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada 45 aterosklerotik ve 50 non-aterosklerotik dokuda C.pne-

umoniae'nin PCR ve ICC ile saptanması arasındaki korelasyonu test etmişlerdir. Ayrıca bu 95 örnekte *Mycoplasma pneumoniae*'nin varlığını da araştırmışlar, aterosklerotik dokularda PCR ve ICC ile *C.pneumoniae*'nin saptanması arasında bir korelasyon bulmuşlardır. Her iki testte de 10 örnekte pozitif ve 17 örnekte negatiflik saptamışlardır ($p=0.003$). Non-aterosklerotik örneklerde PCR ve ICC arasında anlamlı bir korelasyon bulamamışlar ($p=ns$), bir aterosklerotik örnekte PCR ile *M.pneumoniae* saptamışlardır. Bu çalışma aterosklerotik dokularda *C.pneumoniae* saptanmasında PCR ve ICC arasındaki korelasyonu göstermekte, *C.pneumoniae* ve ateroskleroz arasındaki ilişkiyi vurgulamakta ve bu ilişkinin spesifitesini desteklemektedir.

Elektron mikroskopu, PCR ve ICC gibi yöntemlerin kullanılması ile çalışmalar daha ileri boyutlarda yapılabilir. Fakat *C.pneumoniae*'nin koroner ateroskleroz patogenezindeki rolünün tam olarak açıklanabilmesi için çalışmaların devamına gereksinim vardır.

TEŞEKKÜR

Kanların hastalardan temininde göstermiş olduğu yakın ilgiden dolayı Prof. Dr. Bekir Kocazeybek'e teşekkür ederiz.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No: T-699/280699) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Barnes RC: Laboratory diagnosis of human chlamydial infection. *Clin Microbiol Rev* 27:119 (1989).
2. Mahony J B, Coombes B K, Chernesky M A: Chlamydia and Chlamydia. "Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover F C (eds). *Manual of Clinical Microbiology*" 8. baskı, s.991, ASM Press, Washington, (2003).
3. Eraksoy H: Klamidyal pnömoniler "Topçu AM, Söyletir G, Doğanay M (ed). *İnfeksiyon Hastalıkları*" s.376 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul (1996).
4. Fukushi H, Katsuya H: Chlamydia pecorum - The fourth species of genus Chlamydia. *Microbiol Immunol* 37:515 (1993).

5. Schachter J, Stomm WE: Chlamydia. "Murray PR, Baron ET, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover F C (eds): *Manual of Clinical Microbiology*" 6. baskı, s.669, American Society for Microbiology, Washington, (1995).
6. Serter D, Dereli D: Chlamydia psittaci-Chlamydia pneumoniae infeksiyonları ve bunların ülkemizdeki güncel durumları. "Anđ Ö, Ağaçfıdan A (ed): 1. Ulusal Chlamydia İnfeksiyonları Sempozyumu Bildirileri" s.45, Türk Mikrobiyol Cem Yayın No. 23, İstanbul (1995).
7. Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Ekman MR, Mäkelä TH, Huttunen JK, Valtonen V: Serological evidence of an association of a novel Chlamydia TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2:983 (1988).
8. Grayston JT: Infections caused by Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *Clin Infect Dis* 15:757 (1992).
9. Blasi F, Denti F, Erba M, Cosentini R, Raccanelli R, Rinaldi A, Fagetti L, Esposito G, Rubetti U, Allegra L: Detection of Chlamydia pneumoniae but not Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. *J Clin Microbiol* 34:2766 (1996).
10. Puolokkoinen M, Kuo CC, Shor A, Wang JP, Grayston JT, Campbell LA: Serological response to Chlamydia pneumoniae in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol* 31:2212 (1993).
11. Miettinen H, Lehtos, Saikku P, Haffner SM, Rönömaa T, Pyörala K, Laakso M: Association of Chlamydia pneumoniae and acute dependent diabetic and non-diabetic subjects in Finland. *Eur Heart J* 17:682 (1996).
12. Serter D: Klamidyalar. "Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları" s.94, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (1997).
13. Nieminen MS, Mattila K, Valtonen V: Infection and inflammation as risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J*, 14:12 (1993).
14. Melnick SL, Sharar E, Folsom MD, Grayston JT, Sorlie PD, Wang SP, Szklo M: Past infection by Chlamydia pneumoniae strain TWAR and asymptomatic carotid atherosclerosis. *Am J Med*, 95:499 (1993).
15. Saikku P: Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 14:62 (1993).
16. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman MR, Manninen V, Manttari M, Frick MH, Huttunen JK: Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Int Med* 116:273 (1992).
17. Thom DH, Grayston JT, Siscowck PS, Wong SP,

Weiss NS, Doling JR: Association of prior infection with Chlamydia pneumoniae and angiographically demonstrated coronary artery disease. JAMA 268:68 (1992).

18. Thom DH, Wang SP, Grayston JT, Siscovic DS, Stewart DK, Kronmal RA, Weiss NS: Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. Arterioscler Thromb 11:547 (1991).

19. Leinonen M, Mattila K, Kohlmeier L, Saikku P: Chlamydia pneumoniae specific antibodies and immune complexes in German patients with acute myocardial infarction. Circulation 87:1130 (1993).

20. Campbell LA, Edward RO, Cappucio AL, Kuo CC, Wang SP, Stewart D, Patton DL, Cummings PK, Grayston JT: Detection of Chlamydia pneumoniae TWAR in human coronary atherectomy tissues. J Infect Dis 172:585 (1995).

21. Kawashima N, Kawada J.: Chlamydia pneumoniae antibody titers in patients with acute ischemic stroke. Rinsho Shinkeigaku 40:1063 (2000).

22. Yılmaz E, Ağaçfidan A, Yılmaz G, Koylan N, Nişancı Y, Meriç M: Koroner Kalp hastalarında C.pneumoniae infeksiyonu yeni bir risk faktörü olabilir mi? "Anğ Ö, Badur S, Ağaçfidan A (ed): 1. Ulusal Chlamydia infeksiyonları Sempozyumu Bildileri" s.83, Türk Mikrobiyol, Cem Yayın No. 23, İstanbul (1995).

23. Maraha B, Berg H, Scheffer GJ, van der Zee A, Bergmans A, Misere J, Kluytmans J, Peeters M: Correlation between detection methods of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic and non- atherosclerotic tissues. Diagn Microbiol Infect Dis 39:139 (2001).