

ATEROSKLEROTİK KALP HASTALARINDA *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* 'NİN SEROLOJİK TANISINDA ENZİM İMMUNOASSAY (EIA)'İN KULLANIMI

ENZYME-IMMUNOASSAY IN THE SEROLOGIC DIAGNOSIS OF *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* IN ATHEROSCLEROTIC CARDIAC DISEASE

Aydın AYDINLI¹ Gül DURMAZ¹ Tercan US¹ Yurdanur AKGÜN Ahmet ÜNALIR²

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir

¹ Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Kardiyoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Chlamydia pneumoniae*, ateroskleroz, tanı, mikro-immunofloresans (MIF), enzim-immunassay (EIA)

Key Words: *Chlamydia pneumoniae*, atherosclerosis, diagnosis, microimmunofluorescence (MIF), enzyme-immunassay (EIA)

ÖZET

Bu çalışmada; *Chlamydia pneumoniae*, enfeksiyonunun serolojik tanısında kullanılan IgA, IgM ve IgG antikorlarının saptanmasında enzim-immunassay (EIA)'in değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aterosklerotik kalp hastalığı tanısı konulan 71, kontrol grubu olarak 20 olmak üzere toplam 91 hasta çalışmaya alındı. *Chlamydia pneumoniae*ye karşı oluşan IgA, IgM ve IgG antikorları EIA ve mikro-immunofloresans (MIF) yöntemleri ile saptandı. *Chlamydia pneumoniae* IgM pozitifliği EIA ve MIF yöntemlerinin her ikisi ile %12; IgA pozitifliği EIA yöntemi ile %52, MIF yöntemi ile % 44; IgG pozitifliği ise EIA yöntemi ile %85.3, MIF yöntemi ile %45.3 olarak saptandı. Kronik *C. pneumoniae* enfeksiyonunun serolojik tanısında EIA'in cinse özgül olması nedeni ile uygun olmadığı, türe özgül yeni ticari kitlelere gereksinim olduğu sonucuna ulaşıldı.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate enzyme-immunoassay EIA in the detection of IgA, IgM and IgG antibodies in the serological diagnosis of *C. pneumoniae* infection. Seventy-one patients, diagnosed as atherosclerotic heart disease and 20 patients as control group, totally 91 patients, were studied. ImmunoglobulinA, IgM and IgG antibodies against *C. pneumoniae* were detected by EIA and micro-immunofluorescence (MIF) methods. *Chlamydia pneumoniae* IgM positivities were 12% with both of EIA and MIF; IgA positivities 52% with EIA and 44% with MIF; IgG positivities 85.3% in with EIA and 45.3% with MIF. It was concluded that, because of EIA is genus-specific, new species-specific commercial kits are needed for the serological diagnosis of chronic *C. pneumoniae* infection.

GİRİŞ

Zorunlu hücre içi bakteriler olan klamidyalar bifazik yaşam döngüleri ve oluşturdukları hastalıklar ile ilgi çekmektedirler. *Chlamydiales* takımının *Chlamydiaceae* ailesinin üyesi olup tek cins olan *Chlamydia*'nın dört türü vardır:

C. trachomatis, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* ve *C. pecorum*. Bunlardan ilk üçü kesin insan patojeni olup *C. pecorum*'un henüz insanda patojenliği saptanmamıştır (1). Yaklaşık 20 yıldır bilinen bir klamidy türü olan *C. pneumoniae*'nin faranjit, sinüzit, pnömoni gibi hastalıklara neden olduğu bilin

mektedir. Ancak son yıllarda *C. pneumoniae* infeksiyonlarının sarkoidoz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve erişkin yaşta başlayan astma ile beraber olduğuna ilişkin bilgiler yayınlanmaktadır. Kronik *C. pneumoniae* infeksiyonu ile aterosklerotik kalp hastalıkları arasındaki ilişki de son yıllardaki yoğun araştırma konularından biri olmuştur (2).

Klamidyaların diğer tüm mikro-organizmalardan farklı bir yaşam döngüleri vardır. Elementer cisim (EB) ve retiküler cisim (RB) adı verilen farklı iki morfolojik yapıdan oluşurlar. Elementer cisimler; küçük, sferik (*C. pneumoniae*'de armut şeklinde), 250-300 nm çapında göreceli olarak sağlam ve hücre dışı ortamda canlılığını devam ettirebilen, ancak replike olmayan infeksiyöz yapılardır. Elementer cismin hücre duvarının rijit olmasının nedeni esas dış zar proteini (major outer membrane protein=MOMP) ve pek çok sistince zengin protein arasındaki çapraz disülfid bağlarıdır. Retiküler cisimler ise daha büyükçe olup (800-1200 nm) hücre içindedirler. Metabolik olarak aktif ve replike olabilen partiküllerdir. Elementer cisimlerde görülen çapraz disülfid bağları bunlarda yoktur (1).

Klamidyaların hücre duvarlarında dış ve iç sitoplazmik membranlar ile lipopolisakarit (LPS) bulunur. Hücre duvar yapıları Gram-negatif bakterilerin hücre duvar yapısına benzer, ancak peptidoglikan tabakaları yoktur (1-3). Dış membran pek çok protein içermektedir, bu proteinlerden biri olan MOMP klamidy türleri arasındaki farklılıkları belirleyen tür, alt-tür ve serovara özgü antijenik domenlere sahiptir; MOMP, hücrenin tüm ağırlığının %60'ını oluşturur. Klamidy LPS'i, cinse özgü LPS-protein kompleksinin bir komponentidir. İmmünodominant grubu 2-keto-3-deoksioktanik asittir. Bu madde, *Enterobacteriaceae* R mutantlarının "core" LPS'leri ile benzerdir, ancak idantik değildir. Esas dış zar proteini (MOMP), 60 kDa ağırlığında bir ısı şoku proteini yapısındadır, oluşturdukları hastalıkların immüнопатolojisinde rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır (2).

Chlamydia pneumoniae tanısı, laboratuvarında mikro-organizmayı elde etmek zor olduğundan direkt antijen saptaması ile veya serolojik yöntemlerle yapılır. Direkt antijen saptaması için immünofluoresans veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); serolojik tanı için ise enzimimmünassay (EIA) veya mikro-immunfloresans (MIF) yöntemleri kullanılır. Klamidy infeksiyonlarının serolojik tanısında MIF yöntemi "altın standart" olarak tanımlanmaktadır (4).

Klamidy infeksiyonlarının tanısını LPS'ye karşı monoklonal ve poliklonal antikorları kullanarak gerçekleştiren pek çok EIA kiti piyasada bulunmaktadır. Bu yöntem, bir katı yüzeye (plastik boncuk, mikrotitrasyon çukuru veya membranı) bağlanmış antikor tarafından suda eriyebilen LPS antijeninin (cinse özgü) yakalanması ve daha sonra bir enzim ile işaretli detektör sistem ve bir kromojenik substrat aracılığı ile saptanması esasına dayanır. Renk değişimi olması

pozitif olarak kabul edilir ve gözle ya da spektrofotometrik olarak değerlendirilebilir. Sadece EIA pleyti ve okuyucu gerektirir, özel bir deneyim gerektirmez, çok fazla örneğin bir arada incelenmesi ve otomasyon için uygundur. Enzim-immünassay yönteminin duyarlılığı değişkenlik göstermekle beraber, genellikle immünfloresans kadardır. Yanlış pozitif sonuçlar göreceli olarak sıktır. Bu, belki de diğer bakterilerin LPS'leri ile çapraz reaksiyonuna bağlı olabilir. Özgül olmayan reaksiyonlar sık olabilir ve bunlar çalışmanın tekrar edilmesine neden olurlar. Örneğin; pozitif prediktif düzey, sadece pozitif sonuçlar kabul edilip çalışma tekrarlandığında %87'den %95'e çıkar (5). Enzim-immünassay yönteminin yönteminin en önemli dezavantajları, örnek kalitesinin floresans mikroskopideki kadar değerlendirilememesi ve türe özgü ticari kitlerin henüz yeterli olmaması, bu nedenle de cinse özgü kitlerle çalışmak zorunda kalınmasıdır (5-9).

İnfeksiyonun serolojik tanısı genellikle serokonverziyonun gösterilmesine, IgG düzeylerindeki veya total antikor düzeyindeki artışa ya da özgül IgM'nin varlığına bağlıdır. Özgül klamidy IgM'sinin saptanması neonatal klamidy pnömonisi tanısında yararlıdır. İmmünglobulin G antikorunun saptanması maternal veya neonatal infeksiyonun ayırımında kullanılamayacağından, neonatal infeksiyonun tanısında IgM saptanması tanısaldır.

Klamidy infeksiyonunun saptanması için kullanılan standart yöntemlerden biri olan MIF yönteminde serovara özgü antikorları saptamak için standart serovaların EB'leri kullanılır. Bu yöntemde, alternatif olarak cinse özgü antijenler yani RB'ler de kullanılabilir. Klamidyaların cins ve tipe özgü antikorlarını saptamada lama yerleştirilmiş hücredeki inklüzyonlar kullanılabilir. Mikro-immunfloresans yöntemi özellikle *C. pneumoniae*'ye özgü antikorları saptamak için kullanılmaktadır; IgA, IgG veya IgM'den herhangi birisini saptamak üzere uyarlanabilir, böylece infeksiyonun yeni veya eski olduğu kolayca ayırdedilebilir. Türe özgü IgM hastalık başladıktan üç hafta sonra, IgG ise altı-sekiz hafta sonra belirginleşir (5). Mikro-immunfloresans ile akut *C. pneumoniae* infeksiyonu tanısı için;

- IgG, IgM veya IgA titresinde dört kat veya daha fazla artış olması,
- IgM'nin 1/20 veya daha yüksek titrede pozitif olması,
- IgG'nin yüksek titrede olması (1/512 veya daha fazla) gereklidir.

Geçirilmiş *C. pneumoniae* infeksiyonu tanısı için IgG'nin 1/32 veya daha büyük, 1/512'den küçük olması gereklidir. Kronik *C. pneumoniae* infeksiyonu tanısı için ise son zamanlarda *C. pneumoniae* infeksiyonu düşünülen ve IgG titresini 1/512 veya daha fazla olan ayrıca IgA titresinin 1/40 veya daha fazla olması gereklidir. İmmünglobulin A titresinin 1/16 veya daha fazla olması ile IgG titresinin 1/128

veya daha fazla olmasının birlikteliği, aktif *C. pneumoniae* enfeksiyonunun göstergesidir (5, 10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Eskişehir ve çevresinde yaşayan değişik kardiyak yakınmalarla Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Servisi'ne yatırılarak myokart infarktüsü (MI) tanısı konulan, yaşları 18-75 (S.D. 56.04 ± 2.81) arasında değişen 19'u erkek, altısı kadın toplam 25 hasta ile; "unstable angina pectoris" (UAP) tanısı konan, yaşları 36-74 (S.D.61.57 ± 1.29) arasında değişen 33'ü erkek, 18'i kadın toplam 51 hasta alındı. Kontrol grubu olarak, koroner anjiyografide herhangi bir damar tıkanıklığı bulunmayan, elektrokardiyografi ve fizik muayene bulguları ile aterosklerotik kalp hastalığı olarak değerlendirilmeyen, hipertansiyon ve Diabetes mellitusu bulunmayan, ailelerinde aterosklerotik kalp hastalığı tanımlamayan, Eskişehir civarında yaşayan, yaşları 43-84 (S.D. 63.35 ± 2.64) arasında değişen onbiri erkek, dokuzu kadın olmak üzere toplam 20 kişi rastgele yöntemle çalışmaya alındı. Tüm hasta ve kontrollere koroner anjiyografi uygulandı.

Hastalar ve kontrollerden serum örnekleri alınarak, dondurma-çözdürme işleminin tekrarlanması önlemek için iki ayrı tüpte çalışılınca kadar saklanmak üzere -70°C' de donduruldu.

Klamidyaya karşı oluşan IgA, IgM ve IgG antikorları kantitatif olarak Medac (Medac Diagnostica, Hamburg/Almanya) IgA, IgM ve IgG EIA kitleri kullanılarak saptandı. İmmunglobulin A için sulandırma solüsyonu ile 1/50 oranında sulandırıldı (10 µl serum + 490 µl sulandırma solüsyonu), IgM için önce yıkama solüsyonu ile 1/25 oranında (10 µl serum + 240 µl sulandırma solüsyonu) daha sonra RF ile yanlış pozitifliği önlemek için çalışmada önerilen "IgG/Rf-Absorbans" solüsyonu ile 1/2 oranında karıştırılarak 1/50 son solüsyonları elde edildi. İmmunglobulin G için ise serum örnekleri 1/100 oranında (5 µl serum + 495 µl sulandırma solüsyonu) sulandırıldı. Enzim-immunassay uygulamaları, kitlerin çalışma kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi, sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerin 405 nm dalga boyundaki absorbans değerleri üzerinden saptanan "sınır değer (cut-off)" dikkate alınarak yorumlandı.

İmmunglobulin A ve IgM EIA kitlerinde, çalışma prosedüründe önerildiği gibi negatif kontroller 0.20'den küçük, pozitif kontroller ise 0.80'den büyük; IgG kitinde de negatif kontroller 0.22'den küçük, pozitif kontroller ise 0.80'den büyük bulunarak güvenilirliği kanıtlandı.

Enzim-immunassay yöntemi çalışmaları sonunda sınır değerleri kitte önerildiği gibi hesaplandı ve örneğin karşı geldiği absorbans değeri hesaplanan sınır değerine bölünerek "indeks" bulundu. Her bir çalışmada indeks değer-

lerine karşı gelen sulandırılmalar önerilen tabloya bakılarak saptandı. İmmunglobulin A ve IgM; 1/50'den, IgG ise 1/100'den başlayan sulandırılmalarla değerlendirildi.

Chlamydia pneumoniae'ye karşı oluşan özgül antikorların (IgA, IgM ve IgG sınıfı) ölçümünde "microimmunofluorescein (MIF) antibody test" (MRL Diagnostics, IF 1200A, IF1200M, IF 1200G; California/ABD) kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan MIF lamları, yolk sac (sarı kese) kontrolü ile beraber *C. psittaci* (6BC, DD34), *C. trachomatis* (D-K olmak üzere altı serotip) ve *C. pneumoniae* (TW183) EB'lerinden elde edilen antijenlerin her lamda 12 çukurda üçü yanyana (sarı kese kontrolü ile beraber dört) olacak şekilde hazırlanmıştı. Kullanılan konjugat ise IgA için µ zinciri, IgM için µ zinciri ve IgG için de µ zinciri spesifik floresan ile işaretli anti-human antikorlardı. MIF IgA ve MIF IgG için hasta serumları 1/16 oranında phosphate buffered saline (PBS), Mikro-immunfloresans IgM için ise serum örnekleri serumda bulunabilecek RF'nin ortadan kaldırılabilmesi için, kit içerisinde verilen IgM "pre-treatment diluent" ile 1/10 oranında (10 µl serum + 90 µl pretreatment diluent) sulandırıldı.

Poşetlerinden çıkartılan antijen içeren lamların üzerine her bir çalışmada pozitif kontrol, negatif kontrol ve uygun sulandırılmaları hazırlanan serum örnekleri 25'er µl olacak şekilde konuldu. Mikro-immunfloresans IgA ve IgG lamları 30'ar, MIF IgM lamları ise 90'ar dakika 37°C'de nemli kamarada inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fosfat tampon solüsyonu (PBS) ve distile su ile yıkanan lamlar havada kurutuldu. Kuruyan lamların üzerine 25'er µl konjugatları konuldu ve hepsi 30'ar dakika 37°C'de nemli kamarada tekrar inkübe edildi. Distile su ve PBS ile yıkanan lamlar havada kurutuldu ve üzerlerine birer damla kaplama sıvısı konulup lamel ile kapatıldılar ve Nikon Eclipse E600 floresans mikroskop kullanılarak 400 x büyütme ile incelendiler.

Bir veya daha fazla, parlak elma yeşili spot görülen serum örnekleri daha sonra ikişer kat PBS ile sulandırılarak son sulandırılmaları saptandı. İmmunglobulin A ve IgG titrasyonları 1/16'dan, IgM titrasyonları da 1/10'dan başlayan sulandırılmalarda idi. Hiç parlaklık görülmeyen örnekler negatif olarak kabul edildi.

BULGULAR

Enzim-immunassay yöntemi ile *C. pneumoniae* IgA pozitifliği ($\geq 1/50$) AMI grubunda 15 hastada (%60), UAP grubunda 24 hastada (%48) olmak üzere toplam 39 hastada (%52); kontrol grubunda da altı hastada (%33.3) saptandı.

Mikro-immunfloresans yöntemi ile *C. pneumoniae* IgA pozitifliği ($\geq 1/16$) AMI grubunda 10 hastada (%40), UAP grubunda 23 hastada (%45.1) olmak üzere toplam 33 hastada (%44); kontrol grubunda da yedi hastada (%35) saptandı.

Tablo 1. EIA ve MIF yöntemleri ile *C. pneumoniae* IgA , IgM ve IgG pozitiflikleri

Antikor Yöntem	IgA		IgM		IgG	
	EIA	MIF	EIA	MIF	EIA	MIF
Sulandırım sınırı değeri	(≥1/50)	(≥1/16)	(≥1/50)	(≥1/10)	(≥1/10)	(≥1/16)
Hasta grubu	% 52	%44	% 12	% 12	%85.3	%45.3
Kontrol grubu	% 33.3	% 35	% 11	% 10	% 55.55	% 10

EIA: Enzim-immunassay, MIF: Mikro-immunfloresans

Tablo 2. *C. pneumoniae* serolojik tanısında MIF yöntemi doğru kabul edildiğinde EIA yönteminin özellikleri

	Duyarlılık	Özgüllük	P.P.D.*	N.P.D.**	Accuracy
EIA IgA	% 74.4	% 74	% 71.1	% 77.1	% 74.4
EIA IgM	% 100	% 98.8	% 91.7	% 100	% 98.9
EIA IgG	% 86	% 25	% 42.5	% 73.6	% 48.9

EIA: Enzim-immunassay, MIF: Mikro-immunfloresans

* P.P.D.= Pozitif prediktif değer, ** N.P.D.= Negatif prediktif değer

Enzim-immunassay yöntemi ile *C. pneumoniae* IgM pozitifliği (≥1/50) AMI grubunda üç hastada (%12), UAP grubunda altı hastada (%12) olmak üzere toplam dokuz hastada (%12); kontrol grubunda da iki hastada (%11) saptandı.

Mikro-immunfloresans yöntemi ile *C. pneumoniae* IgM pozitifliği (≥1/10) AMI grubunda üç hastada (%12), UAP grubunda altı hastada (%12) olmak üzere toplam dokuz hastada (%12); kontrol grubunda da iki hastada (%11) saptandı.

Enzim-immunassay yöntemi ile *C. pneumoniae* IgG pozitifliği (≥1/100) AMI grubunda 23 hastada (%92), UAP grubunda 41 hastada (%82) olmak üzere toplam 64 hastada (%85.3); kontrol grubunda da 10 hastada (%55.6) saptandı.

Mikro-immunfloresans yöntemi ile *C. pneumoniae* IgG pozitifliği (≥1/16) AMI grubunda 14 hastada (%56), UAP grubunda 20 hastada (%39.2) olmak üzere toplam 34 hastada (%45.3); kontrol grubunda da iki hastada (%10) saptandı (Tablo 1).

Çalışmada; *C. pneumoniae* MIF IgA yöntemi doğru kabul edildiği zaman; EIA IgA yönteminin duyarlılığı %74.4, özgüllüğü %74, pozitif prediktif değer %71.1 ve negatif prediktif değer %77.1 olarak bulundu. Yöntemin geçerliliği (accuracy) ise %74.2 olarak hesaplandı.

Mikro-immunfloresans IgM yöntemi doğru olarak kabul edildiğinde; EIA IgM yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %98.8, pozitif prediktif değer %91.7 ve negatif prediktif değer %100 olarak bulundu. Yöntemin geçerliliği de %98.9 olarak saptandı.

Mikro-immunfloresans IgG yöntemi doğru kabul edildiği zaman; EIA IgG yönteminin duyarlılığı %86, özgüllüğü %25, pozitif prediktif değer %42.5 ve negatif prediktif

değer %73.6 olarak bulundu. Yöntemin geçerliliği de %48.9 olarak saptandı (Tablo 2).

TARTIŞMA

Chlamydia pneumoniae infeksiyonunun tanısında hücre kültürü, PCR ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır (4, 5, 7-9, 11-19). *Chlamydia pneumoniae*'nin hücre kültürü ile üretilmesi çok başarılı sonuçlar vermediğinden PCR ve serolojik yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Serolojik yöntemler, göreceli olarak kolay ve daha ucuz olmaları nedeni ile *C. pneumoniae* tanısında tercih edilmektedirler (5). Mikro-immunfloresans yöntemi, infeksiyon sırasında *C. pneumoniae* EB'lerin MOMP'lerine karşı oluşan özgül antikorların saptanmasında kullanılan güvenilir bir tanı yöntemidir ve *C. pneumoniae* infeksiyonunun serolojik tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Mikro-immunfloresans yöntemi, kullanılan kite göre farklı değerlendirme kriterlerine sahip olabilir, floresans mikroskoba ve deneyimli kullanıcıya gereksinim gösterir (4, 7, 19-22). Kolay bir yöntem olması, eldeki teknik personelle çalışabilmesi ve floresans mikroskoba gereksinim göstermemesi nedeni ile klamidya LPS'ne karşı oluşan IgA, IgM ve IgG antikorlarını saptamak ve serolojik tanıda MIF yöntemi ile karşılaştırmak için EIA yöntemi kullanıldı.

Tuuminen ve ark. (4), MIF yönteminin klamidyal infeksiyonların serolojik tanısında altın standart olmasına rağmen değişik sulandırım oranları nedeniyle sonuçların değerlendirilmesinde sorunlar çıkabileceğini; bu nedenle bu konuda bir standardizasyona gereksinim olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada; üretici firmanın önerileri doğrultusunda IgA için 1/16, IgM için 1/10 ve IgG için ise 1/16 ve üzerindeki sulandırım değerleri pozitif olarak alındı.

Numazaki ve ark. (23) EIA yöntemi ile yaptıkları çalışmada, çocuklarda ve erişkinlerde *C. pneumoniae* IgA ve IgG antikorlarını araştırmışlar, sonuçlarını MIF yöntemi ile karşılaştırdıklarında, EIA yönteminin IgA için duyarlılığını %84.6, özgüllüğünü %86.7 olarak; IgG için ise duyarlılığını %90.4, özgüllüğünü ise %89.9 olarak saptamışlar, bu bulgularla EIA yöntemini *C. pneumoniae* IgA ve IgG saptanmasında başarılı olarak buldular. Bu çalışmada ise; MIF IgA yöntemine göre EIA IgA yönteminin duyarlılığı %74.4, özgüllüğü %74 olarak; MIF IgG yöntemine göre EIA IgG yönteminin duyarlılığı %86, özgüllüğü ise %25 olarak bulundu. Numazaki ve ark. (23)'nin yaptığı çalışmada; çocuk, genç ve erişkinlerde genel olarak IgA ve IgG taramaları, bu ise sadece belli bir hastalık grubunda antikor aranması yöntemlerin özgüllüklerindeki farkı yaratmış olabilir, ancak IgG açısından duyarlılıkları yakın olarak görülmektedir.

Gnarpe ve ark. (7), piyasada klamidya serolojik tanısında kullanılan EIA kitlerinin cinsine özgü olması nedeniyle yeni bir türe özgü (*C. pneumoniae*) EIA kitini MIF yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında hasta serumunda

fazla miktarda *C. trachomatis* antikor bulduğunda bu yeni kitin *C. pneumoniae* ve *C. trachomatis* antikorlarını ayırtımadığını, bu nedenle farklı klamidyal antikorları göstermede MIF yönteminin yerini alamıyacağını bildirmişlerdir.

Messmer ve ark. (8), 83 serum örneğinde *C. pneumoniae* nin serolojik tanısı için Gnarpe ve ark. (7)'nin kullandıkları kiti kullanarak yaptıkları çalışmada; *C. trachomatis* ve *C. psittaci* antikorları ile çapraz reaktivite saptamışlar ve sözkonusu kitlerin klinik tanıda kullanılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim olduğunu bildirmişlerdir.

Enzim-immunassay yönteminde daha yüksek pozitiflik olmasının nedeni; iki yöntem arasında önerilen pozitiflik sulandırılmalarının farklılığının yanısıra EIA yönteminin, cinsine (genus) özgü LPS'ye karşı gelişen antikorları saptaması olabilir.

Sonuç olarak, aterosklerotik kalp hastalarındaki kronik *C. pneumoniae* enfeksiyonunun serolojik tanısında EIA yönteminin yüksek pozitiflik vermesi nedeni ile türe özgü yeni ticari kitlere gereksinim olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Odeh M, Oliven A. Chlamydial infections of heart. *Eur J Microbiol Infect Dis* **1992**; 11: 885-93.
2. Schachter J, Stamm WE. *Chlamydia*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press, **1995**: 669-77.
3. Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfid bonding in outer membran structure and permeability in *C. trachomatis*. *Infect Immun* **1984**; 44: 479-85
4. Tuuminen T, Palomaki P, Paavonen J. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *J Microbiol Methods* **2000**; 42: 265-79.
5. Gwendolyn LG. *Chlamydia*. In: Gwendolyn LG, ed. *Practical Medical Microbiology*. New York: Churchill-Livingstone Co, **1996**: 621-33.
6. Anđ Ö, Badur S, Ağaçfidan A, ed. *Chlamydia Enfeksiyonları ve Tanıda Yenilikler*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 20. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, **1994**.
7. Gnarpe J, Naas J, Lundback A. Comparison of a new commercial EIA kit and the microimmunofluorescence technique for the determination of IgG and IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *APMIS* **2000**; 108: 819-24.
8. Messmer TO, Martinez J, Hassouna F, et al. Comparison of two commercial microimmunofluorescence kits and an enzyme immunoassay kit for detection of serum immunoglobulin G antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* **2001**; 8: 588-92.
9. Halvorsen DS, Borvik T, Njolstad I, Gutteberg TJ, Vorland LH, Hansen JB. *Chlamydia pneumoniae* IgA- and IgG antibodies in young survivors of myocardial infarction. A comparison of antibody detection by a microimmunofluorescence test and an enzyme immunoassay. *J Intern Med* **2002**; 251: 142-7.
10. Fryden A, Kihlström E, Maller R, Person K, Romanus V, Ansehn S. A clinical and epidemiological study of "ornithosis" caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (Strain TWAR). *Scand J Infect Dis* **1989**; 21: 681-91.
11. Mattila KJ. Viral and bacterial infections in patients with acute myocardial infarction. *J Intern Med* **1989**; 225: 293-6.
12. Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* **1996**; 125: 979-82.
13. Carlisle SS, Nahata MC. *Chlamydia pneumoniae* and coronary heart disease. *Ann Pharmacother* **1999**; 33: 615-22.
14. Vercellotti G. Infectious agents that play a role in atherosclerosis and vasculopathies. What are they? What do we do about them? *Can J Cardio* **1999**; 15 (Suppl B): 13-5.
15. Jackson LE, Campbell LA, Schmidt RA, et al. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma. Evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* **1997**; 150: 1785-90.
16. Mlot C. Chlamydia linked to atherosclerosis. *Science* **1996**; 272: 1422.
17. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* **1998**; 281: 35-7.
18. Gura T. Infections: A cause of artery-clogging plaques? *Science* **1998**; 281: 35-7.
19. Freidank HM, Vögele H, Echert K. Evaluation of a new commercial microimmunofluorescence test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1997**; 16: 685-8.

20. **Demirel K, Albay A, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Gün H.** Akut myokard infarktüsü ve koroner arter hastalıklarında *Chlamydia pneumoniae* seroprevalansının araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg* **1998**; 55: 85-9.
21. **Verkooyen RP, Hazenberg MA, Haaren GH, et al.** Age related interference with *Chlamydia pneumoniae* microimmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 1287-90.
22. **Kishimoto T, Matsushima T, Morikawa T, Kawagoe K.** Assay of specific anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies by ELISA method. Setting o serological criteria [Abstract]. *Kansenshogaku Zasshi* **1999**; 73: 457-66.
23. **Numazaki K, Ikebe T, Chiba S.** Detection of serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* by ELISA. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1996**; 14: 179-83.