

KISA BİLDİRİ:
ÜRETRİT SEMPTOMLARI OLMAYAN HIV POZİTİF ERKEKLERDE *NEISSERIA GONORRHOEAE* VE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* VARLIĞI*

SHORT COMMUNICATION:
 SCREENING FOR *NEISSERIA GONORRHOEAE* AND *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
 IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS POSITIVE MEN WITHOUT
 URETHRITIS SYMPTOMS

İştar DOLAPÇI, Alper TEKELİ**, Esra KOYUNCU****
Gülşay SAIN GÜVEN*, Serhat ÜNAL*****

ÖZET: İnsan immün yetmezlik virusu (HIV) dışında kalan bazı diğer cinsel yolla bulaşan hastalık ajanları da HIV enfeksiyonunun bulaşmasının kolaylaşmasında önemli rol oynarlar. Bu çalışmanın amacı, üretrit semptomları bulunmayan 18 HIV pozitif erkek ile kontrol grubu olarak üretrit semptomları bulunan 70 HIV negatif erkekte *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* prevalansının saptanmasıdır. Tüm olgulardan alınan idrar örneklerine *C.trachomatis* ve *N.gonorrhoeae* için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanmıştır. Üretrit semptomları göstermeyen HIV pozitif erkeklerde *N.gonorrhoeae* prevalansı, üretrit semptomlu HIV negatif erkeklerinkinden anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). HIV pozitif bireylerin, diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından da yüksek risk grubunda oldukları göz önüne alındığında, bu hastalarda enfeksiyon zincirinin kırılması açısından *N.gonorrhoeae* taramasının faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV.

ABSTRACT: Some of the sexually transmitted diseases' agents other than human immunodeficiency virus (HIV) take an active part in transmission of HIV infection. The objective of the study was to determine the prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in 18 HIV positive men without urethritis symptoms and in 70 HIV negative men with urethritis symptoms as control group. The urine samples were screened for *C.trachomatis* and *N.gonorrhoeae* using polymerase chain reaction (PCR). The prevalence of *N.gonorrhoeae* in HIV positive men without urethritis symptoms was significantly higher than that in HIV negative men with urethritis symptoms ($p<0.05$). HIV positive individuals should

* Bu çalışma XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (19-23 Eylül 2004) poster olarak sunulmuştur.

** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

be considered as a high-risk group in respect to the other sexually transmitted diseases, thus necessitating screening for *N.gonorrhoeae* in order to break the infectious chain in these patients.

Key words: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, HIV.

GİRİŞ

Birbirinden farklı özelliklere sahip çok sayıda etken tarafından oluşturulan cinsel yolla bulaşan hastalıklar (CYBH), geçmişte olduğu gibi günümüzde de dünyanın hemen her bölgesinde önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. 1980'li yılların başlarında insan immün yetmezlik virusu (HIV)'un ortaya çıkışı ve daha sonra HIV/AIDS dışında kalan bazı CYBH etkenlerinin HIV'in bulaşmasında etkin rol oynadıklarının anlaşılması ile CYBH'a yöneltilen dikkat daha da artmıştır. Aynı zamanda idrar örneklerinin kullanıldığı invaziv olmayan testlerin geliştirilmesi de, gerek bu hastalıkların prevalanslarının araştırılmasına, gerekse önlenmelerine yönelik çalışmalara hız vermiştir^{1,2}.

Bu çalışmada, HIV pozitif hastalarda cinsel yolla bulaşan *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* prevalansının araştırılması ve üretral akıntı ve disüri gibi üretrit semptomları olmayan HIV pozitif erkek hastalar ile, üretrit semptomları olan HIV negatif erkek hastalardaki oranların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler: Çalışma grubunu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nde takip edilmekte olan HIV pozitif ve herhangi bir üretrit şikayeti bulunmayan 18 erkek olgu (yaş ortalaması: 39.7 yıl) ile kontrol grubu olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Üroloji polikliniğine üretral akıntı ve disüri şikayetleriyle başvuran 70 erkek olgu (yaş ortalaması: 35.2 yıl) oluşturdu. Hasta ve kontrollerden alınan sabah ilk akım idrar örnekleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Tanı ve Araştırma Laboratuvarı'nda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *C.trachomatis* ve *N.gonorrhoeae* varlığı yönünden incelendi. Tüm örnekler iki ayrı steril kapta toplandı; bunlardan birisi hiç bekletilmeden çalışmaya alınırken, diğeri 4°C'de saklandı.

HIV pozitif hastaların ortalama CD4 sayıları 439.42/mm³ olup, 13'ünün (%72.2) şüpheli cinsel ilişki (3'ü homoseksüel), 2'sinin (%11.1) kan transfüzyonu, 1'inin (%5.5) damar içi ilaç kullanımı yolu ile enfekte olduğu, 2'sinde (%11.1) ise bulaş yolunun belirlenemediği saptandı. Hem hasta hem de kontrol grubunu oluşturan olgularda, alınan örneklerle direkt mikroskopik inceleme ya da kültür yöntemleri uygulanmadı ve olguların hiçbirisi örneklerin alındığı sırada üretrit semptomlarına yönelik tedavi almamaktaydı.

DNA Eldesi ve PCR: DNA eldesi klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak yapıldı³. Hastalardan alınan 10 ml ilk idrar örneği 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 500 µl distile suda çözüldü ve buradan alınan 60-100 µl örnek ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla; örnek 250 µl lizis solüsyonu içerisinde 10 µl

proteaz enzimi ile 0.5 mM Tris HCl pH:8.0, 1 mM EDTA ve %0.1 SDS varlığında 42°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnek üzerine 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkol eklendi ve 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası süpernatanda oluşan üstteki faz, 500 µl propil alkolle karıştırıldı, santrifüj edildi. Pellet 500 µl etil alkolle çözüldü ve 12.000 rpm de 5 dakika santrifüj sonrasında 42°C'de bekletilerek alkolün uçması sağlandı. Elde edilen örnek "DNase-RNase free" ultrasaf su ile sulandırıldı ve PCR aşamalarında kullanıldı.

PCR, 50 µl son hacimde gerçekleştirildi ve reaksiyon karışımı her iki mikroorganizma için de; 1 U Taq DNA polimeraz (Bioron GmbH), 1'er µl 50pmol primer, 200 mMol dNTP miksi ve 2.5mMol MgCl₂'den oluşmaktaydı. Her mikroorganizma için amplifikasyon ilk denatürasyon 94°C'de 5 dakika ve takiben 40 siklus 94°C–30 sn, 58°C–30 sn, 72°C–35 sn ve son uzama 72°C 10 dakika olacak şekilde ayrı ayrı PCR reaksiyonları ile "Techgene Techne FTGENE 5D termal cycler"da gerçekleştirildi. Primer olarak, *C.trachomatis* için, majör dış membran protein (omp1F) geni (5'-GATAGCGAGCACAAAGAGAGCTAA-3' ve 5'-TTCACATCTGTTTGCAAAACACGG-3'); *N.gonorrhoeae* için, plazmid pJD1 *N.gonorrhoeae* DNA'sını hedefleyen baz dizileri (5'-GCTACGCATACCCGCGTTGC-3' ve 5'-CGAAGACCTTCGAGCAGA-3') seçildi.

Elde edilen ürünler, %2 agaroz jel içerisinde 0.5µg ml⁻¹ EtBr (Ethidium Bromide) varlığında, 1X Tris borat tamponu içerisinde 100 V elektrik akımında yürütüldü ve jeller UV altında incelendi. "DNA MicroMarker-Hae III digest of pUC 18 plasmid (Ambresco)" moleküler cetvel olarak kullanıldı.

PCR sonucu negatif çıkan örneklerde inhibitör aktiviteden kaçınmak amacıyla, 4°C'de saklanan örneklerden tekrar ekstraksiyon yapıldı ve elde edilen DNA'lar 1/1 ve 1/10 oranlarında sulandırılarak deneyler tekrarlandı⁴.

İstatistiksel Değerlendirme: Verilerin istatistiksel analizi Fisher's Exact Test ile yapıldı.

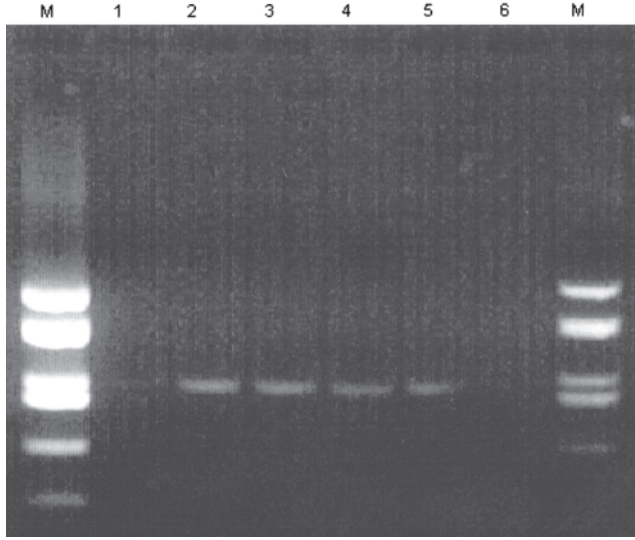
BULGULAR

C.trachomatis, 18 HIV pozitif erkek hastanın 3'ünde (%16.6) ve 70 kontrol bireyin 4'ünde (%5.7) pozitif olarak saptanmış, iki grup arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir (p=0.148). *N.gonorrhoeae* için ise bu oranlar sırasıyla %27.7 (5/18) ve %8.6 (6/70) olarak bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu saptanmıştır (p=0.043).

Pozitif reaksiyon gösteren PCR ürünleri Resim 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

HIV/AIDS, ilk tanımlandığı yıllardan bu yana geçen 20 yılı aşkın sürede, yaklaşık 22 milyon kişinin ölümüne yol açmıştır. Günümüzde dünyada uygulanan korunma çabalarına rağmen yaklaşık 42 milyon kişinin HIV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir^{5,6}. HIV enfeksiyonu esas olarak cinsel yol ile bulaşan bir hastalıktır. Özellikle genital ülseratif hastalıkların, mukozal bariyerleri zayıflatarak HIV bulaş riskini 2-5 kat yükseltmeleri, hem seminal hem plazma HIV yükünü artırmaları



Resim 1: Pozitif hastalardan seçilen iki farklı mikroorganizmaya ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonuçları [M: moleküler marker (587, 458, 434, 298, 267, 257, 171, 102, 80); 1 ve 6: negatif kontrol; 2 ve 3: *C.trachomatis* (282bp); 4 ve 5: *N.gonorrhoeae* (282bp)].

ve HIV/AIDS tedavisinde problemler yaratmaları gibi nedenlerle, diğer CYBH da son yıllarda daha büyük önem kazanmışlardır. Bununla birlikte asemptomatik üretritin HIV bulaşının artışıdaki muhtemel rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır ve araştırmalar devam etmektedir^{4,7,8}.

Erkeklerde üretritin en sık görülen etkenleri olan *C.trachomatis* ve *N.gonorrhoeae* enfeksiyonlarının etkilerini araştıran çalışmalarda; bu enfeksiyonların genital sekresyonlardaki viral yükü ve HIV'in enfeksiyözitesini artırdıkları ve bunların tedavisi ile HIV enfeksiyözitesinin azaldığı belirtilmektedir⁹⁻¹¹. Bu durumda bu enfeksiyonların erken tanısı daha da büyük önem kazanmaktadır.

Asemptomatik hastalarda gonokokal ve klamidyal enfeksiyonların tarama ve tanısı için, geleneksel kültür ya da antijen saptama metotları yerine, idrarda nükleik asit amplifikasyon testlerinin (NAAT) uygulanması önerilmektedir. NAAT, hem daha duyarlı olması hem de genital sürüntüye gerek kalmadan ve invaziv işlem gerektirmeyen idrar örneği ile çalışılabilmesi nedeniyle daha uygundur^{2,12,13}. Bu nedenle bizim çalışmamızda da idrar örneği tercih edilmiş ve kültüre göre daha yüksek duyarlılığı nedeniyle PCR kullanılmıştır.

Çalışmamızda, HIV pozitif erkeklerde, herhangi bir üretrit semptomu olmamasına rağmen, *C.trachomatis* ve *N.gonorrhoeae* varlığı araştırılmış ve bulgular kontrol olarak alınan üretrit semptomları olan HIV negatif erkek hastalardaki sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak asemptomatik HIV negatif bireylerin düşünülmemesinin nedeni; bu olgularda gerek gonokok gerekse klamidyaya pozitiflik oranının, semptomatik HIV negatif olgulara kıyasla düşük çıkma olasılığından

kaynaklanmaktadır. Ayrıca HIV enfeksiyonunun CYBH açısından risk artırıcı bir faktör olduğunun vurgulanması için kontrollerin semptomatik HIV negatif olgulardan oluşmasının uygun olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, asemptomatik HIV pozitif olgular ile semptomatik HIV negatif olgular arasında *C.trachomatis* açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, *N.gonorrhoeae*'nin semptomatik kontrol olgularında, asemptomatik HIV pozitif olgulardan daha düşük oranda saptandığı izlenmiştir. Gonokok pozitifliği saptanan beş olgu ile klamidy pozitifliği saptanan üç HIV pozitif olgunun hepsinde, HIV bulaş yolunun şüpheli cinsel ilişki olması da dikkat çekici bulunmuştur. Bu veriler, asemptomatik olsalar bile HIV pozitif bireylerin diğer CYBH açısından da taramaları gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hitchcock PJ. Screening and treatment of sexually transmitted diseases: an important strategy for reducing the risk of HIV transmission. AIDS Patient Care STDS 1996; 10:10-5.
2. Jeffrey DK, Charlotte KK. HIV and sexually transmitted diseases. Postgrad Med 2004; 115: 79-84.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual, p.E.3-E. Book 2. 1989, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
4. Mahony J, Chong S, Jang D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. J Clin Microbiol 1998; 36: 3122-6.
5. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 33-42.
6. Munoz-Perez MA, Rodriguez-Pichardo A, Camacho Martinez F. Sexually transmitted diseases in 1161 HIV-positive patients: a 38-month prospective study in southern Spain. J Eur Acad Dermatol Venereol 1998; 11: 221-6.
7. Winter AJ, Taylor S, Workman J, et al. Asymptomatic urethritis and detection of HIV-1 RNA in seminal plasma. Sex Transm Inf 1999; 75: 261-3.
8. Mabey D. Interactions between HIV infection and other sexually transmitted diseases. Trop Med Int Health 2000; 5: A32-36.
9. Cohen MS, Hoffman IF, Royce RA, et al. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. AIDSCAP Malawi Research Group. Lancet 1997; 349: 1868-73.
10. McClelland RS, Wang CC, Mandalia K, et al. Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1. AIDS 2001; 15: 105-10.
11. Rotchford K, Strum AW, Wilkinson D. Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis. Sex Transm Dis 2000; 27: 243-8.
12. Templeton K, Roberts J, Jeffries D, Forster G, Aitken C. The detection of *Chlamydia trachomatis* by DNA amplification methods in urine samples from men with urethritis. Int J STD AIDS 2001; 12: 793-6.
13. Sugunendran H, Birley HD, Mallinson H, Abbott M, Tong CY. Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection in male patients. Sex Transm Infect 2001; 77: 423-6.