

Kronik Adenotonsillitli Olgularda *Chlamydia pneumoniae*'nin Çeşitli Yöntemlerle Araştırılması

Özlem GENÇ^{1*} Devran GERÇEKER² Fikret ŞAHİN² Mustafa Rahmi SAATÇİ³ Zahide ÇİLER TEZCANER³
Serpil DİZBAY SAK⁴ Sibel ÖZTÜRK⁴

¹ Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar

E-mail: drozlemg@hotmail.com

Geliş Tarihi: 03.Temmuz.2018

Kabul Tarihi: 05.Aralık.2018

Özet

Chlamydia pneumoniae sıklıkla atipik pnömoni, farenjit, bronşit, pürülan sinüzit ve seröz otitis media gibi solunum sistemi infeksiyonlarının etkenidir. Bu çalışmanın amacı; kronik adenotonsillitli vakalarda tonsil/adenoid dokuda ve boğaz sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae*'nin varlığının araştırılmasıdır. Çalışmaya 51 hasta ve kontrol grubu olarak 50 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. 51 hastadan 35 tonsil, 19 adenoid olmak üzere toplam 54 doku örneği ve her hastadan 2 boğaz sürüntüsü alınmıştır. Kontrol grubundan da iki boğaz sürüntüsü alınmıştır. Boğaz sürüntü örneklerinden rutin bakteriyolojik incelemeler yapılmıştır. Doku örnekleri ve swab örneklerinde bakterinin *PstI* fragmanına ve 16S rRNA kısmına spesifik primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *C.pneumoniae* DNA'sı araştırılmıştır. Hastalardan alınan doku örnekleri %10 formalinle fikse edilip, parafin ile dondurulduktan sonra 4 µm'lik kesitler alınmış ve tür-spesifik monoklonal antikor kullanılarak immunohistokimyasal (IHC) boyama yapılmıştır. 13 hastanın ve 2 kontrol olgusunun boğaz kültüründe en fazla *Staphylococcus aureus* olmak üzere patojen mikroorganizma üremesi tespit edilmiştir. Hasta grubunda 2 adenoid dokuda ve 2 boğaz sürüntüsünde olmak üzere toplam 4 örnekte *C.pneumoniae* DNA'sı tespit edilmiştir. Kontrol grubunun boğaz sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sı saptanamamıştır. IHC yönteminde, PZR ile *C.pneumoniae* DNA'sı tespit edilen adenoid dokulardan sadece 1'inde *C.pneumoniae* antijenleri saptanmıştır. Fisher-Exact testi kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmede; hasta ve kontrol grubunda boğaz sürüntü örneklerinin PZR sonuçları karşılaştırılmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,27$). Bu çalışmada kronik adenotonsillit ile *C.pneumoniae* arasında direkt bir ilişki bulunmamıştır. *C.pneumoniae* ve kronik adenotonsillit arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla çok sayıda hasta ile sağlıklı kişinin dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Chlamydia pneumoniae*, Kronik adenotonsillit, Polimeraz zincir reaksiyonu, İmmunohistokimya

Investigation of *Chlamydia pneumoniae* with Different Methods in Chronic Adenotonsillitis Cases

Abstract

Chlamydia pneumoniae is the agent of atypical pneumoniae and upper respiratory tract infection. Our aim is; the investigation of the presence of *C.pneumoniae* in tonsil/adenoid tissue and throat swabs in cases of chronic adenotonsillitis. 51 patients 50 healthy people as control group were included in the study. 35 tonsils, 19 adenoid tissues (totally 54 tissues) and 2 throat swab samples of each patient were collected from 51 patients. Two throat swabs were also taken from the control group. Routine bacteriological studies were performed using appropriate culture media. *C.pneumoniae* DNA was investigated by polymerase chain reaction (PCR) via primers targeted *PstI* fragment and 16S rRNA region. After fixation with 10% formalin and freeze in paraffin 4 µm section were received from tissues and this sections were stained by immunohistochemistry (IHC) used species-specific monoclonal antibody. Pathogenic microorganism was detected in 13 patients and 2 control throat cultures. *Staphylococcus aureus* was the most common. In the patient group, *C.pneumoniae* DNA was detected in 4 samples (2 adenoid tissue, 2 throat swab). *C.pneumoniae* DNA was negative in all swabs samples of the control group. With IHC method, *C.pneumoniae* antigens were detected in only 1 adenoid tissue in which *C.pneumoniae* DNA was detected by PCR. According to statistical evaluation using Fisher-Exact test; PCR results on throat swab specimens in the patient and control groups were compared and there was no statistically significant difference ($p=0,27$). According our results; there is no relation between *C.pneumoniae* and chronic adenotonsillitis. More studies are needed to investigate this relationship.

Keywords: *Chlamydia pneumoniae*; Chronic adenotonsillitis; Polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

GİRİŞ

Tonsil ve adenoidler, vücuda ağız yoluyla giren antijenlere karşı sekonder lenfoid organlar olarak immun yanıtın başlamasında önemli rol oynamaktadırlar [1, 2]. Tonsil ve adenoid dokuda bir patojenin aktivitesi ve proliferasyonu lenfoid hücrelerin ve antikor üreten hücrelerin aktivitesini açarsa adenotonsillit meydana gelir [3]. Waldeyer halka-

sındaki bir bölgeyi etkileyen infeksiyonun diğer bölgeleri de etkilememesi söz konusu değildir. Bu nedenle özellikle tonsil ve adenoidlerin etken mikroorganizmaları birbirine benzemektedir [4, 5]. Aerob bakterilerden; Grup A beta hemolitik Streptokoklar, Grup B,C,G Streptokoklar, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus parainfluenza*, *Neisseria* türleri, mikobakteriler, anaerob bakterilerden;

Bacteroides, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* ve *Actinomyces* türleri, virüslerden Epstein Barr, Adenovirüs, İnfluenza A ve B, Herpes Simplex, Respiratuar Sinsityal virüs ve Parainfluenza virüs sayılabilir [6].

Akut adenotonsillitlerin en sık nedeni virüslerdir. Ancak %30 kadarında etken bakterilerdir. Bakteriyel tonsillitlerin en sık nedeni ise A grubu beta hemolitik Streptokoklardır. Bu etkenle oluşan tonsillitlerin çoğu 5-15 yaş arası çocuklarda gözlenir. Klinik bulgularla etkenin viral ya da bakteriyel olup olmadığı anlaşılabilir [5]. Akut tonsillit hızlı bir şekilde başlar ve ateş, boğaz ağrısı, terleme, titreme, yutma güçlüğü, baş ağrısı, halsizlik, eklem ağrıları, nazal konuşma ve boyunda ağrılı lenfadenopati gibi şikayetler ile kendini belli eder [5, 7]. Tanısal test olarak boğaz kültürü ile bakteriyel etken izole edilmelidir. Özellikle bakteriyel adenotonsillitlerde boğaz kültürü altın standarttır [4, 8]. Pürülan burun akıntısı, post nazal akıntı, ateş ve öksürük varlığı adenoid infeksiyonunu düşündürür. Bu duruma sıklıkla sinüzit, otitis media ve servikal lenfadenopati eşlik eder [4]. Uygun medikal tedaviye rağmen bu infeksiyonlar 6 ayda 4 defadan fazla tekrarlıyorsa rekürren adenotonsillit, semptomlar hiç düzelmeyorsa kronik adenotonsillitten söz edilir [5, 9]. Kronik tonsillite sebep olan mikroorganizmalar akut infeksiyonlardaki gibi A grubu beta hemolitik Streptokoklar, Stafilokoklar, *H.influenzae*, alfa hemolitik Streptokoklardır. Kronik tonsillitler 6-15 yaşta sık olmakla birlikte her yaşta görülebilir. Hastalar genellikle tekrarlayan boğaz ağrılarında şikayet ederler [4]. Tonsillitlerin medikal tedavisi; infeksiyon etkeninin ortadan kaldırılması ve destek tedavisi şeklindedir [4,5]. Kronik tonsillitle birlikte halitosiz ve persistan boğaz ağrısı veya persistan servikal lenfadenopati varlığı, obstrüksiyona sebep olan tonsil ve adenoid hipertrofisi adenotonsillektomi endikasyonudur [5].

Chlamydia pneumoniae, insanlarda solunum sistemi infeksiyonlarının yaygın bir etkenidir [10]. Özellikle atipik pnömonilerin başlıca etkenidir [11]. *C.pneumoniae* ilişkili infeksiyonların spektrumu oldukça geniştir. Farenjit, bronşit, bronşiolit ve pnömoni bu spektrum içinde sayılabilir. *C.pneumoniae* genellikle 5-14 yaşlar arasında maruz kazanılmaktadır [12]. *C.pneumoniae*, coğrafi lokalizasyon, yaş grubu ve tanı yöntemlerine göre değişmekle birlikte toplum

kökenli pnömonilerin %6-%19'undan, bronşit ve sinüzit vakalarının % 5'inden sorumlu tutulmaktadır [13]. Asemptomatik respiratuar infeksiyonlara yetişkin ve çocuklarda %70 oranında rastlanmaktadır. Nazofarenks taşıyıcılığının olup olmadığı ve asemptomatik nazofarenks taşıyıcılığının *C.pneumoniae* epidemiyolojisi açısından ne gibi bir role sahip olduğu bilinmemektedir [14].

Şimdiye kadar üst solunum sistemi infeksiyonları ve *C.pneumoniae* ile ilgili araştırmalar genellikle sekretuar otitis mediasi olan çocukların adenoid dokuları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yoğunlaşmanın sebebi son zamanlarda ortaya çıkan bir düşünceye göre *C.pneumoniae*'nin adenoid ve tonsil dokusunda persistan olarak kaldığı ve bu şekilde tekrarlayıcı üst solunum yolu infeksiyonlarına sebep olabileceğidir. Ayrıca bakteriyel bağli kronik antijenik uyarıma karşı oluşan yetersiz immun yanıtın, adenoid hipertrofisine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir [15,16]. Bu düşünceler göz önüne alınarak, biz de bu çalışmada kronik adenotonsillit tanısı almış hastaların boğaz sürüntü örneklerinde ve tonsil/adenoid dokularında *C.pneumoniae*'nin varlığı araştırmayı hedefledik.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmaya; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniğinde tonsillektomi ve/veya adenoidektomi yapılan 51 hasta katılmıştır. Kronik tonsillit tanısı alan, Brodsky sınıflandırması ile 3. ve 4. evre tonsiller hipertrofi [9] saptanan hastalar ve nazofarenksi %50 veya daha fazla obstrükte ettiği tespit edilerek adenoid hipertrofisi tanısı konan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu, akut solunum sistemi yakınması olmayan, kronik adenotonsillit tanısı konmamış ve herhangi bir nedenle son 15 gündür antibiyotik kullanmamış 50 kişiden oluşturulmuştur. Kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından hasta grubu ile uyumlu seçilmiştir. Hasta ve kontrol grubu 2-5, 6-10, 11-18 ve erişkin (18 yaş üzeri) yaş gruplarına ayrılarak incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler için Şekil 1'de verilen adenotonsillektomi takip formu doldurulmuştur.

Şekil 1. Hasta ve kontrol grupları için kullanılan takip formu

ADENOTONSİLEKTOMİ TAKİP FORMU	
Hastanın Adı Soyadı:	Tarih:
Klinik Protokol No:	Araştırma No:
Cinsiyet:	
Doğum Tarihi:	
YAŞ GRUPLARINA GÖRE SINIFLANDIRMA	
a. 2-5	b. 6-10
c. 11-18	d. Erişkin
KLİNİK TANI	
a. Obstrüktif Hipertrofi	b. Kronik infeksiyon
c. Obstrüktif Hipertrofi + Kronik infeksiyon	d. Kontrol
KLİNİK SEYİR	
a. Servikal LAP	
b. Peritonsiller abse	
c. Seröz otitis media	
d. Yüksek ateş / Febril konvülsiyon	
e. Beraberinde bulunan diğer patolojiler	
- Sinüzit []	- Septum deviasyonu / Konka Büllöza []
- Sleep apne []	- Horlama /Ağzı açık uyuma []
- Oklüzyon bozukluğu []	- Adenoid face []
- Enürezis nokturna []	- Sistemik sorunlar [].....

Örnek Alımı ve Transportu

51 hastadan 35 tonsil ve 19 adenoid olmak üzere toplam 54 doku örneği elde edilmiş, bu hastaların 3'ünden hem tonsil hem de adenoid doku alınmıştır. Her doku örneğinin yarısı %10 formalin ile fiske edildikten sonra patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Kalan doku örnekleri Klamidya taşıma besiyeri olan 2SP besiyeri içinde soğuk zincir kurallarına uyularak mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. Kontrol grubundan ve cerrahi operasyon öncesi hastalardan iki ayrı boğaz sürüntü örneği alınmış, bu örneklerden bir tanesi 1,5 ml 2SP taşıma besiyerine (Sukroz, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , fetal calf serum) diğeri rutin bakteriyolojik incelemeler için Stuart taşıma besiyerine (BBL, Becton Dickinson) konularak mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Boğaz Kültürü ve Bakteriyolojik Tanımlama

Stuart taşıma besiyerinde bulunan boğaz sürüntü örnekleri koyun kanlı agar (Merck, Almanya), çukulata agar (Merck, Almanya), MacConkey agar (Lab M, İngiltere) ve Sabouroud Dextroz agar (Lab M, İngiltere) besiyerlerine ekilerek 37° 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Normal boğaz florası dışında üreyen bakteriler, koloni özellikleri, pigment oluşumları ve hemoliz özelliklerine göre değerlendirilmiş ve konvansiyonel yöntemler ile identifikasyonları yapılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu [PZR]

DNA izolasyonu amacıyla doku ilk olarak steril fizyolojik su ile birkaç kez yıkanmış ve daha sonra steril bistüri ile steril cam petri kutusu içinde oldukça küçük parçalara ayrılarak ezilmiştir [17]. 5 mg doku örneği 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içine konulmuş ve doku üzerine 500 µl DNA lizis tamponu (1 M Tris, 0,5 M EDTA, pH=8), 60 µl %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 25 µl proteinaz K (10 mg/ml, Fermentas, Litvanya) ilave edildikten sonra örnek 24 saat 50° C'de kuru ısıtıcı blokta bekletilmiştir. 24 saatin sonunda

örnek üzerine 600 µl fenol eklendikten sonra 3 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatanı yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine 300 µl fenol ve 300 µl kloroform eklendikten sonra 3 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki faz yeni bir tüpe aktararak fenol-kloroform basamağı bir kez daha tekrarlanmıştır. Daha sonra etanolle çöktürme işlemi yapılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Pellet 100 µl steril ddH₂O ile sulandırılmış ve çalışılana kadar -20° C'de saklanmıştır [18].

Sürüntü örneğinden DNA izolasyonu amacıyla ilk olarak eküvyon tüpten çıkarılıp kalan sıvı santrifüj (-4° C, 10.000 rpm, 30 dakika) edilmiştir [19]. Süpernatan atılmış, dipteki pellet üzerine 500 µl DNA lizis tamponu, 60 µl %10'luk SDS ve 18 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek örnek 24 saat 50° C'de kuru ısıtıcı blokta bekletilmiştir. Bu süre sonunda yukarıda anlatıldığı gibi fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol çöktürme işlemi yapıldıktan sonra elde edilen pellet 50 µl steril ddH₂O sulandırılarak çalışılana kadar -20° C'de saklanmıştır [18].

Örneklerde ekstraksiyon sonrası DNA varlığını belirlemek ve PZR inhibitörlerinin olup olmadığını araştırmak amacıyla insan 19.kromozomuna spesifik STK-11ex8s (5' AGA GGA CAT GGC TGA GCT TCT G 3') ve STK-11ex8AS (5' GGC CAG ACA GGC CTG GC TGG TG 3') primerleri kullanılarak PZR çalışılmıştır. Bu primer ile yapılan PZR sonucunda 586 baz çiftlik PZR ürünü oluşmaktadır.

C.pneumoniae'yı araştırmak amacıyla bakterinin *PstI* fragmanına ait spesifik HL-1, HR-1 [20] primerleri ve bu primer ile elde edilen PZR sonuçlarını doğrulamak için Cpn1220R ve CpnA primerleri kullanılmıştır. Primerlerin nükleik asit dizilimleri, hedef bölgeleri ve PZR ürünlerinin uzunluğu Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. PZR'de kullanılan primerler

Primer Adı	Primer sekansı	Hedef Bölge	PZR ürünü uzunluğu
HL-1	5' GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT 3'	PstI fragmanı	437 baz çift
HR-1	5' TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT 3'		
CpnA	5' TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC 3'	16S rRNA	251 baz çift
Cpn1200R	5' CTT CTG TAC TAA CCA TTG TAG 3'		

Örneklerde ekstraksiyon sonrası DNA varlığını belirlemek ve PZR inhibitörlerinin olup olmadığını STK-11ex8s ve STK-11ex8AS primerleri kullanılarak araştırmak amacıyla eküvyon örneklerinden 5'er µl, doku örneklerinden 3'er µl alınarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımı; PZR tamponu [700mM Tris-HCl (pH 8,8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0,1 Tween 20], 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 1,5 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 200 µM, her bir primerden 25 pmol kullanılarak son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler; ısı döngü cihazında (Thermalcycler, Techne, İngiltere); ilk denatürasyon için 94° C'de 5 dakika, daha sonra 40 siklus (94° C'de 1 dakika, 58° C'de 1 dakika, 72° C'de 2 dakika) olacak şekilde çalışılmıştır. Son olarak, örnekler 72° C'de 5 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır. Negatif kontrol olarak steril ddH₂O, pozitif kontrol olarak daha önce içinde insan DNA'sı varlığı bilinen örnek kullanılmıştır.

C.pneumoniae'nin araştırılması amacıyla yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan PZR karışımına eküvyon örneklerinden 5'er µl, doku örneklerinden 3'er µl alınarak eklenmiştir. Örnekler pozitif ve negatif kontroller ile birlikte, HL-1 ve HR-1 primerleri için ısı döngü cihazında; ilk denatürasyon için 94° C'de 5 dakika, daha sonra 40 siklus (94°

C'de 1 dakika, 55° C'de 1 dakika, 72° C'de 2 dakika) olacak şekilde çalışılmıştır. Daha sonra örnekler 72° C'de 5 dakika bekletilerek PZR tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak steril ddH₂O, pozitif kontrol olarak *C.pneumoniae* CDC-CWL-011 [quantitated Bacterial DNA (1.200.000 kopya/ml), İontek, Türkiye] kullanılmıştır.

Sonuçları doğrulamak amacıyla CpnA ve Cpn1220R primerlerinin kullanıldığı PZR çalışmasında yukarıda yapılanlardan farklı olarak ısı döngü cihazında; ilk denatürasyon için 94° C'de 5 dakika, daha sonra 40 siklus (94° C'de 1 dakika, 53° C'de 1 dakika, 72° C'de 1 dakika) olacak şekilde uygulanmış ve örnekler 72° C'de 5 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünün TBE tampon ile hazırlanan %1'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen DNA'lar etidyum bromid (0,5 µg/ml, Amresco, Amerika) ile işaretlenmiş ve UV transilüminatör (Vilber-Lourmat, Fransa) ile incelenmiştir. [21,22]. PZR ürünlerinin büyüklükleri DNA moleküler büyüklük belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jel görüntüleri dijital fotoğraf yardımıyla görüntülenmiştir.

İmmünohistokimyasal boyama [IHC]

IHC inceleme için parafin bloklardan 4 µm'lik kesitler hazırlanmış, bu kesitler özel lamlara (Surgipath x-tra adhesive) yerleştirilmiştir. Hazırlanan kesitlerde deparafinizasyon işlemi ve daha sonra IHC kiti (Dako, Envision System, Amerika) ile boyama yapılmıştır. *C.pneumoniae* tür-spesifik monoklonal antikoru (US Biological, Amerika) örneklerin üzerine 1:30 dilüsyonda damlatılarak 1 saat inkübe edilmiş ve PBS (Phosphate buffered saline, BD, Becton Dickonson) tamponu ile yıkanarak bu solüsyon içinde 10 dakika bekletilmiştir. HRP-işaretili anti-mouse antikor (Dako, Envision System, Amerika) solüsyonu ile 1 saat inkübe edilen örnekler, PBS solüsyonu içinde 5 dakika bekletilmiş ve üzerine DAB (Diaminobenzidin) kromojen damlatılarak 5 dakika inkübe edilmiştir. Yine PBS tamponu ile 5 dakika yıkanan örnekler, Mayer's hematoksilende 5 dakika bekletilmiş, musluk suyunda 5 dakika yıkanmıştır. %80, %90, %100'lük etil alkolde ve ksilen içinde 3'er dakika bekletilerek dehidrate edilmiş ve örnekler nemli ortamda oda sıcaklığında kuruma-ya bırakılmıştır.

Pozitif kontrol olarak daha önceden PZR ile pozitif olduğu gösterilen adenoid doku kabul edilmiş ve negatif kontrol olarak primer antikor yerine PBS damlatılan kesitler kullanılmıştır. Örnekler ışık mikroskopunda 40x10'lük ve 100x10'lük büyütmelemler kullanılarak incelenmiş ve makrofaj benzere hücrelerin sitoplazmalarındaki kahverengi boyanmalar pozitif kabul edilmiştir.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için Fisher-Exact testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya yaşları 2 ile 54 arasında değişen 22'si kadın, 29'u erkek 51 hasta ve yaşları 2 ile 31 arasında değişen 26'sı kadın, 24'ü erkek 50 kontrol olgusu katılmıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması 12,52, kontrol grubunun yaş ortalaması 12,02 idi. Hasta ve kontrol gruplarının yaş gruplarına ve cinsiyetlerine göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Hasta grubundan alınan doku örnekleri 1 ile 54 arasında numaralandırılmış ve 54 örnekten 35'i tonsil, 19'u adenoid doku olarak kaydedilmiştir.

Tablo 2. Hasta ve Kontrol gruplarının yaş gruplarına ve cinsiyetlerine göre dağılımı

	2-5 yaş		6-10 yaş		11-18 yaş		18 yaş üzeri		Toplam
	K	E	K	E	K	E	K	E	
Hasta grubu	4	14	6	7	4	3	8	5	51
Kontrol grubu	7	10	9	5	2	3	8	6	50

Klinik tanı açısından hasta grubu sınıflandırıldığında 15 hastada obstrüktif hipertrofi (%29,4), 18 hastada kronik infeksiyon [%35,3], 18 hastada hem kronik infeksiyon hem de obstrüktif hipertrofi (%35,3) saptanmıştır.

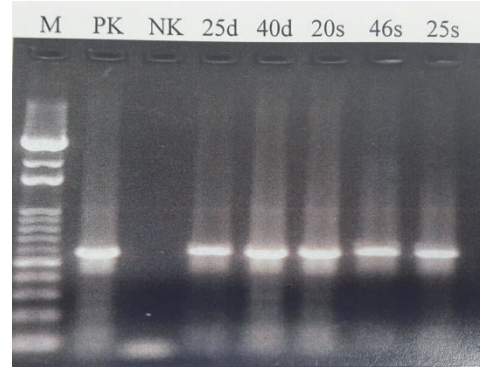
Hastalarda en sık rastlanan bulgunun horlama ve ağzı açık uyuma şikayeti (17 hasta) olduğu gözlenmiştir. Bunu sırasıyla uyku apnesi (14 hasta), seröz otitis media (13 hasta), enürezis nokturna (8 hasta), servikal lenfadenopati (8 hasta), adenoid yüz (8 hasta), oklüzyon bozuklukları (3 hasta), febril konvülsiyon öyküsü (3 hasta), kronik otitis media (1 hasta), peritonsiller abse öyküsü (1 hasta) izlemektedir. Klinik tanılarına göre bulguların görülme sıklığına baktığımızda en fazla bulgu, hem kronik infeksiyon hem de obstrüktif patoloji nedeniyle opere edilen hastalarda gözlenmiştir. Obstrüktif hipertrofi bulunanlarda en fazla seröz otitis media, kronik infeksiyon tanısı konulanlarda servikal lenfadenopati, hem kronik infeksiyon hem de obstrüktif patoloji nedeniyle opere edilen hastalarda horlama ve ağız açık uyuma yakınmaları tespit edilmiştir.

Kontrol grubundan ve cerrahi operasyon öncesinde hastalardan alınan boğaz sürüntü örneklerinin bakteriyolojik incelemesi sonucunda 13 hastanın boğaz kültüründe normal boğaz florasındaki bakterilerin dışında patojen mikroorganizma üremesi olmuştur. 10 hastada *S.aureus*, 1 hastada *Escherichia coli*, 1 hastada *P.aeruginosa*, 2 hastada A grubu beta hemolitik Streptokok üremiştir. Bir hastada A grubu beta hemolitik Streptokok ve *P.aeruginosa* olmak üzere birden fazla mikroorganizmanın ürediği gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise sadece 2 boğaz kültürü örneğinde *S.aureus* üremiştir.

Hasta ve kontrol grubundan alınan doku örnekleri ile boğaz sürüntü örneklerinde ekstraksiyon sonrası PZR inhibitörlerinin olup olmadığını araştırmak ve DNA varlığını belirlemek amacıyla yapılan PZR ile tüm örneklerde DNA saptandığından örneklerin *C.pneumoniae* PZR çalışmalarına

uygun olduğu belirlenmiştir. Resim 1'de insan 19.kromozomuna spesifik primerler [STK-11ex8S, STK-11exAS] ile yapılan PZR sonuçları görülmektedir.

Resim 1. STK-11ex8S ve STK-11ex8AS primerleri ile yapılan PZR çalışma sonuçları.

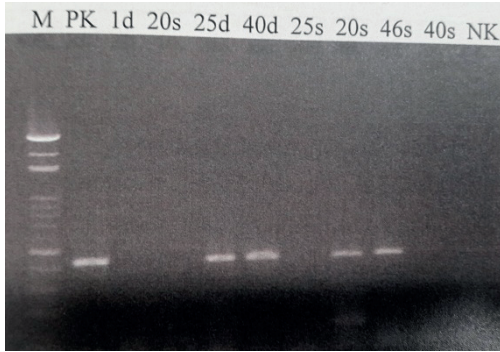


PK: pozitif kontrol, **NK:** negatif Kontrol, **M:** moleküler büyüklük belirteci, **s:** sürüntü örneği, **d:** doku örneği

Örneklerde *C.pneumoniae* DNA'sını araştırmak amacıyla bakterinin *PstI* fragmanına spesifik primerler ile yapılan PZR'da 2 adenoid doku örneğinde DNA tespit edilmiştir (Resim 2). Bu adenoid dokular obstrüktif hipertrofi tanısı nedeniyle cerrahi girişim uygulanmış olan hastaların örnekleridir (Tablo 3). *C.pneumoniae* DNA'sı saptanan ve 6-10 yaş grubunda olan hastalardan birinin boğaz kültüründe *S.aureus* kolonizasyonu tespit edilmiştir. Her iki hastanın sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sı saptanmamıştır.

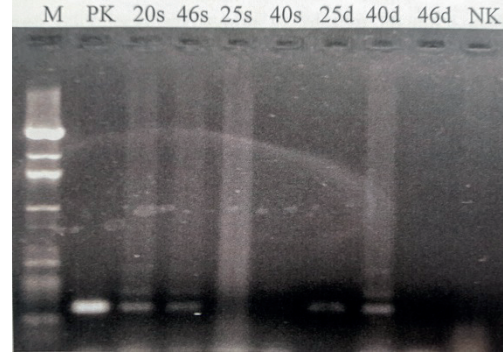
Hastalardan cerrahi girişim öncesinde alınan boğaz sürüntü örneklerinin 2'sinde *C.pneumoniae* DNA'sı tespit edilmiştir (Resim 2). Bu hastalardan birisi obstrüktif hipertrofi ve kronik infeksiyon tanısıyla adenoidektomi uygulanan, diğeri kronik infeksiyon tanısı ile tonsillektomi yapılan hastalardır. İlk hasta 25 yaş grubunda, ikinci hasta erişkin yaş grubunda idi. Bu hastaların doku örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sı saptanmamıştır. *C.pneumoniae* 16S rRNA bölgesini hedefleyen primerler ile tüm örnekler tekrar çalışılmış, aynı örneklerde aynı sonuçlar elde edilmiştir (Resim 3). Kontrol grubunda hiçbir örnekte *C.pneumoniae* DNA'sı saptanmamıştır.

Resim 2. *C.pneumoniae* PstI fragmanına spesifik primerler ile yapılan PZR sonuçları. Pozitif örnekler: 25 ve 40 numaralı doku, 20 ve 46 numaralı sürüntü örnekleri.



PK: pozitif kontrol, **NK:** negatif Kontrol, **M:** moleküler büyüklük belirteci, **s:** sürüntü örneği, **d:** doku örneği

Resim 3. *C.pneumoniae* 16S rRNA fragmanına spesifik primerler ile yapılan PZR sonuçları. Pozitif örnekler: 25 ve 40 numaralı doku, 20 ve 46 numaralı sürüntü örnekleri.



PK: pozitif kontrol, **NK:** negatif Kontrol, **M:** moleküler büyüklük belirteci, **s:** sürüntü örneği, **d:** doku örneği

Tablo 3. PZR ve IHC ile *C.pneumoniae* araştırılan hastaların klinik tanı açısından dağılımı

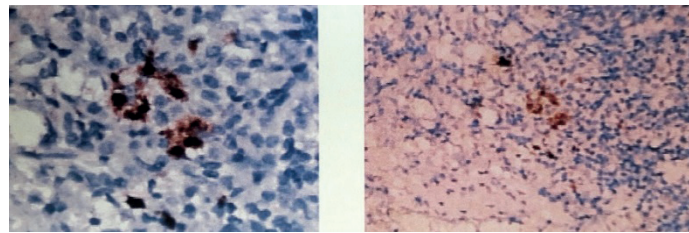
	Kronik infeksiyon	Obstrüktif hipertrofi	Kronik infeksiyon + Obstrüktif hipertrofi	Toplam
PZR pozitif	1	2	1	4
PZR negatif	17	13	20	50
IHC pozitif	0	1	0	1
IHC negatif	18	14	21	53

Rutin histopatolojik incelemeler sonucunda tüm dokularda kronik infeksiyon bulguları saptanmış, ayrıca obstrüktif hipertrofi tanısı alanlarda histopatolojik olarak lenfoid hiperplazi bulguları da tespit edilmiştir.

IHC yönteminde, PZR ile *C.pneumoniae* DNA'sı tespit edilen adenoid doku örneklerinden sadece 1'inde

C.pneumoniae antijenleri saptanmıştır. Makrofaj benzeri hücrelerin sitoplazmasındaki kahverengi boyanmalar pozitif olarak kabul edilmiştir. *C.pneumoniae* tespit edilen örnekte pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayılarının az olduğu ve doku kesitinin küçük bir alanında toplanma eğiliminde oldukları gözlenmiştir (Resim 4).

Resim 4. Doku örneklerinde yapılan IHC çalışması sonucu elde edilen görüntü.



A

B

A: 40x10'luk büyütme, B:100x10'luk büyütme

Çalışmamızın sonuçlarının Fisher-Exact testi kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmesinde; hasta ve kontrol grubunda boğaz sürüntü örneklerinde yapılan PZR sonuçları karşılaştırılmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,27$). Ayrıca PZR ile adenoid dokularda *C.pneumoniae* saptanan hastaların ve IHC ile *C.pneumoniae* antijeni saptanan hastaların sayıları ile bunların klinik tanıları arasındaki ilişki karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (sırasıyla $p=0,64$; $p=0,08$).

TARTIŞMA

Akut yada kronik tonsillite neden olan ve sıklıkla rutin incelemelerde aranan bakterilerin dışında, özellikle de medikal tedavinin başarısız olduğu ve boğaz sürüntüsü örneklerinde patojen bir bakteri üremesinin olmadığı vakalarda laboratuvar şartlarında tespit edilmesi zor, *C.pneumoniae* gibi hücre içi bir bakterinin de akla gelmesi gerekmektedir. *C.pneumoniae* sıklıkla atipik pnömoni etkeni olan hücre içi bir bakteridir. Bunun yanı sıra farenjit, bronşit, bronşiolit, pürülan sinüzit ve seröz otitis media gibi diğer akut ve kronik solunum sistemi infeksiyonlarına da sebep olmaktadır [23]. Tüm yaş gruplarında hastalık oluşturabilir [24].

C.pneumoniae'nin sebep olduğu solunum sistemi infeksiyonları genellikle hafif veya asemptomatik olarak ortaya çıkmaktadır. Asemptomatik solunum sistemi infeksiyonlarına yetişkin ve çocuklarda %70 oranında rastlanmaktadır [25]. Günümüzde asemptomatik infeksiyonu saptamak amacıyla genellikle PZR yönteminden yararlanılmaktadır [26]. Çalışmalar özellikle çocukluk yaş grubunda daha fazladır. PZR ile yapılan bu çalışmalarda asemptomatik çocuklarda boğaz sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sı saptanma oranı %6 ile %23 arasında değişmektedir [27, 28].

Akut solunum sistemi infeksiyonu bulguları gösteren çocuklarda yapılan çalışmalarda *C.pneumoniae* DNA'sı saptanma oranı da %3 ile %1 arasında olmak üzere oldukça farklılık göstermektedir [29-31]. Schmidt ve ark.'nın yaptığı geniş çaplı bir çalışmada alt solunum sistemi hastalıklarının %11'inden, üst solunum yolu hastalıklarının ise %4'ünden PZR ile *C.pneumoniae* DNA'sı tespit edilmiştir [32]. Fransa'da yapılan ve hasta sayısının oldukça fazla olduğu bir çalışmada, pnömonili hastaların %4,1'inde bronşitli hastaların %3,4'ünde olmak üzere alt solunum sistemi infeksiyonlarının toplam %7,5'inden *C.pneumoniae* sorumlu tutulmuştur [33].

Bakterinin solunum sisteminde persistan kalabileceği yönündeki düşünceler ile yapılan çalışmalarda da yeterli sonuç elde edilememiş ve persistan kalma oranının %3 ile %10 arasında değiştiği saptanmıştır [28,34].

Semptomatik, asemptomatik yada persistan alt solunum yolu hastalıkların yanı sıra otitis media, akut ve kronik farenjit, kronik sinüzit gibi üst solunum yolu infeksiyonlarında da *C.pneumoniae*'nin rolü araştırmaların konusu olmaktadır. Falck ve ark.'nın çalışmalarında *C.pneumoniae*'nin kronik farenjit ve otitis media ile ilişkisi PZR ve IHC yöntemleri kullanılarak araştırılmış ve bu ilişkiyi doğrulayacak sonuçlar elde etmişlerdir [35-37]. Ancak bu sağlam ilişki Esposito ve ark.'nın çalışmasında saptanmamış ve *C.pneumoniae*'nin sıklıkla akut farenjitte ko-patojen olduğu sonucuna varılmıştır [38].

Üst solunum sisteminin önemli bir parçası olan adenoid tonsil dokusunun *C.pneumoniae* için bir rezervuar gibi davranarak, tekrarlayıcı üst solunum yolu infeksiyonlarına sebep olabileceği ve bu nedenle araştırılması gerekliliği son zamanlarda ortaya çıkan düşüncelerden birisi-

dir. *C.pneumoniae*'nin persistan infeksiyon oluşturabilme özelliğinden dolayı kronik antijen stimülasyonu ve düşük derecedeki inflamasyon nedeniyle bakteriyeye karşı oluşan yetersiz immün cevabın, adenoid hipertrofisi patogenezine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir [15,16]. Ayrıca *C.pneumoniae*'nin hücrel apoptozu ve silier aktiviteyi azalttığı ve [39] ve bu şekilde adenoid hipertrofisine de neden olduğu düşünülmektedir [16].

Adenoid dokuda *C.pneumoniae*'nin varlığını araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır. *C.pneumoniae* DNA'sının varlığı genellikle sekretuar otitis media'sı olan çocuklarda adenoid dokuda araştırılmıştır. Engstrand ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada adenoid hipertrofisi nedeniyle adenoidektomi yapılan ve 10'unda sekretuar otitis media da bulunan 20 çocuğun adenoid dokusunda IHC ve PCR yöntemiyle *C.pneumoniae* varlığını araştırmışlar ve PZR ile her iki gruptan 3'er doku örneğinde *C.pneumoniae* DNA'sını saptarken, IHC ile örneklerin hepsini pozitif bulmuşlardır. Boğaz sürüntüsü ve orta kulak sıvısında ise 2'ser hastada PZR ile *C.pneumoniae* DNA'sı belirlenmişler, sadece 1 çocukta hem adenoid hem de orta kulak sıvısında DNA saptamışlardır [15]. Normann ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise rekküren otitis media, akut seröz otitis media ve nazal obstrüksiyon nedeniyle adenoidektomi yapılan 69 çocukta PZR ile %7, IHC ile %98,5 oranında pozitiflik saptanmıştır [16].

Biz çalışmamızda kronik adenotonsillit tanısı alan hastalarda adenoid veya tonsil dokusu ile boğaz sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae* araştırdık. Kontrol grubu olarak seçilen 50 sağlıklı kişinin boğaz sürüntü örnekleri alınmış ve PZR ile *C.pneumoniae* DNA'sı araştırılmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir. Kronik adenotonsillit tanısı konan 51 hastanın 2 doku ve 2 boğaz sürüntü örneği olmak üzere toplam 4 örnekte [%7,4] *C.pneumoniae* DNA'sı saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında boğaz sürüntü örneklerinde yapılan PZR sonuçları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda doku ve boğaz sürüntü örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sı pozitif saptanan vakalar farklıdır. Kronik veya rekürren tonsilliti olan vakalarda tonsil yüzeysel ve derin mikroflorasının farklı olduğu bilinmektedir [40-42]. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *C.pneumoniae* için de bu durum geçerli olabilir. Sürüntü örneklerinde ve doku örneklerinde *C.pneumoniae* DNA'sının aynı kişilerin örneklerinde saptanmaması bu şekilde açıklanabilir.

C.pneumoniae antijenlerini araştırmak için kullanılan IHC yönteminin doku morfolojisi görme infeksiyon etkeninin spesifik olarak bulunduğu hücreleri saptama gibi avantajları bulunmaktadır. IHC, kültür ve PZR gibi diğer yöntemlere göre bakteriyi daha fazla saptama oranına sahip görülmektedir. Bunun nedeni; antijene göre DNA'nın daha fazla bozulması, dokulardan DNA izolasyonun zor olması ve PZR inhibitörlerinin varlığıdır [43]. Çalışmamızda 25 tonsil ve 19 adenoid dokuda IHC yöntemiyle, sadece 1 adenoid doku örneğinde pozitiflik saptanmıştır. IHC ile tespit edilen örnek PZR ile DNA saptanan adenoid doku örneğidir. Engstrand ve ark. ve ayrıca Normann ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda IHC yöntemi ile dokuların neredeyse hepsinde pozitiflik (%98-%100) saptanırken, aynı dokularda PZR ile pozitiflik oranları (%7 ile %30 arasında) düşüktür [15,16]. Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışmalardan oldukça farklıdır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

IHC ile *C.pneumoniae* tespit edilen örnekte pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayılarının oldukça az olduğu ve doku kesitinin küçük bir alanında toplanma eğilimde oldukları gözlenmiştir. Bu bulgu kronik Chlamydia infeksiyonlarında gözlenen bir bulgudur [44]. Engstrand ve ark'da çalıştıkları adenoid dokuların bir çoğunda pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayılarının oldukça az olduğunu bildirmişlerdir [15].

Çalışmamızın sonuçlarına göre kronik adenotonsillit ile *C.pneumoniae* arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ancak *C.pneumoniae* birçok infeksiyona neden olduğundan kronik adenotonsillit etiolojisinde de önemli olabilir. Bu ilişkiyi araştırmak amacıyla daha uzun bir süreç içinde ve çok sayıda hasta ile sağlıklı kişinin dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

[1] Brandtzaeg P. 2003. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 67 (Suppl 1): S69-76.

[2] Perry M, Whyte A. Immunology of tonsils. 1998. Immunol Today, 19 (9): 414-421.

[3] Nave H, Gebert A, Pabst R. 2001. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. Anat Embryol (Berl), 204 (5): 367-373.

[4] Tekat A. 2002. Oral kavite ve farenks infeksiyonları. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi kitabında (ed. Çelik O), Turgut Yayıncılık, İstanbul, pp. 545-552.

[5] Kara CO. 2004. Tonsil-adenoid ve farenks infeksiyonları. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi kitabında (ed. Koç C), Güneş Kitabevi, Ankara, pp. 825-833.

[6] Thompson LDR, Wenig BM, Kornblut AD. 2001. Pharyngitis. In Byron J. Bailey Head&Neck Surgery-Otolaryngology (ed. Bailey BJ, Calhoun KH, Tardy JR GB), Vol 1, Lipincott Williams&Wilkins, USA, pp. 543-554.

[7] Doğan Ö. 2000. Orofarenks hastalıkları. Otolaryngoloji Baş ve Boyun Cerrahisi kitabında (ed. Şenocak D), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, pp 236-244.

[8] Johnson BC, Alvi A. 2003. Cost-effective workup for tonsillitis. Testing, treatment, and potential complications. Postgrad Med, 113 (3): 115-8, 121.

[9] Brodysk L, Poje C. 2001. Tonsillitis, tonsillectomy, adenoidectomy. In Byron J. Bailey Head&Neck Surgery-Otolaryngology (ed. Bailey BJ, Calhoun KH, Tardy JR GB), Lipincott Williams&Wilkins, USA, Vol 1, pp. 979-991.

[10] Higgins DP, Hemsley S, Canfield PJ. 2005. Immuno-histochemical demonstration of the role of *Chlamydiaceae* in renal, uterine and salpingeal disease of the koala, and demonstration of *Chlamydiaceae* in novel sites. J Comp Pathol, 133 (2-3): 164-174.

[11] Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA, Grayston JT. 1995. Chlamydia pneumoniae (TWAR). Clin Microbiol Rev, 8 (4): 451-461.

[12] Jackson LA, Graystone JT. 2000. *Chlamydia pneumoniae*. In Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Disease (ed. Mandell GL, Bennet JE, Doblin R), Churchill Livingstone, USA, Vol 2, pp. 2007-2014.

[13] Normann E. 2003. *Chlamydia pneumoniae* in children-epidemiology and clinical implication. In Comprehensive Summaries up Uppsala Dissertation from the Faculty of

Medicine (ed. The Dean of the Faculty of Medicine), Acta Universitatis Uppsaliensis: Uppsala, 49 pp.

[14] Principi N, Esposito S. 2001. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. Lancet Infect Dis, 1 (5): 334-344.

[15] Engstrand I, Augustsson I, Bergemalm PO, Falck G, Gnarpe J, Gnarpe H. 2001. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in the adenoid from children with and without secretory otitis media using immunohistochemistry and PCR. Scand J Infect Dis, 33 (2): 132-137.

[16] Normann E, Gnarpe J, Nääs J, Gnarpe H, Karlsson MG, Wettergren B. 2001. *Chlamydia pneumoniae* in children undergoing adenoidectomy. Acta Paediatr, 90 (2): 126-134.

[17] Temizkan G. 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler: Genel Bakış. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler kitabında (ed. Temizkan G, Nazlı A), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, pp. 1-53.

[18] www.riedlab.nci.nih.gov/publication.

[19] Campbell LA. PCR detection of *Chlamydia pneumoniae*. 1993. In Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications (ed. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ), American Society for Microbiology, Washington, pp. 247-252.

[20] Campbell LA, Perez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. 1992. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 30 (2): 434-442.

[21] Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler kitabında (ed. Temizkan G, Arda N), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, pp 101-120.

[22] Podzorski RP. Gel electrophoresis, southern hybridization and restriction fragment length polymorphism analysis. 2004. In Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice (ed. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y, Unger ER, Rlman DA, White TJ), ASM Press, Washington, pp. 273-280.

[23] Mahony JB, Coombes BK, Chernesky MA. 2003. *Chlamydia* and *Chlamydia*. In Manual of Clinical Microbiology (ed. Murray PR), ASM Press, Washington, pp. 991-1004.

[24] Berdal BP, Scheel O, Ogaard AR, Hoel T, Gutteberg TJ, Anestad G. 1992. Spread of subclinical *Chlamydia pneumoniae* infection in a closed community. Scand J Infect Dis, 24 (4): 431-6.

[25] Hyman CL, Augenbraun MH, Roblin PM, Schachter J, Hammerschlag MR. 1991. Asymptomatic respiratory tract infection with *Chlamydia pneumoniae* TWAR. J Clin Microbiol, 29 (9): 2082-2083.

[26] Miyashita N, Niki Y, Nakajima M, Fukano H, Matsushima T. 2001. Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. Chest, 119 (5): 1416-1424.

[27] Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, Wettergren B. 2005. *Chlamydia pneumoniae* infection predicts a reduced risk for subsequent atopic disease. Acta Paediatr, 94 (6): 705-10.

[28] Schmidt SM, Muller CE, Mahner B, Wiersbitzky SK. 2002. Prevalence, rate of persistence and respiratory tract symptoms of *Chlamydia pneumoniae* infection in 1211 kindergarten and school age children. Pediatr Infect Dis J, 21 (8): 758-62.

[29] Normann E, Gnarpe J, Gnarpe H, Wettergren B.

1998. *Chlamydia pneumoniae* in children attending day-care centers in Gävle, Sweden. *Pediatr Infect Dis J*, 17 (6): 474-481.

Suppl 3: S432-437.

[30] Tjhih JH, Dorigo-Zetsma JW, Roosendaal R, Van Den Brule AJ, Bestebroer TM, Bartelds AI, Vandenbroucke-Grauls CM. 2000. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute respiratory infection in general practices in The Netherlands. *Scand J Infect Dis*, 32 (1): 13-19.

[31] Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P. 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol*, 36 (2): 539-542.

[32] Schmidt SM, Müller CE, Krechting M, Wiersbitzky H, Gürtler L, Wiersbitzky SK. 2003. *Chlamydia pneumoniae* carriage and infection in hospitalized children with respiratory tract diseases. *Infection*, 31 (6): 410-415.

[33] Gaillat J, Flahault A, deBarbeyrac B, Orfila J, Portier H, Ducroix JP, Bébéar C, Mayaud C. 2005. Community epidemiology of *Chlamydia* and *Mycoplasma pneumoniae* in LRTI in France over 29 months. *Eur J Epidemiol*, 20 (7): 643-651.

[34] Ben-Yaakov M, Eshel G, Zaksonski L, Lazarovich Z, Boldur I. 2002. Prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in an Israeli population without clinical evidence of respiratory infection. *J Clin Pathol*, 55 (5): 555-562.

[35] Falck G, Heyman L, Gnarpe J, Gnarpe H. 1995. *Chlamydia pneumoniae* and chronic pharyngitis. *Scand J Infect Dis*, 27 (2): 179-182.

[36] Falck G, Engstrand I, Gad A, Gnarpe J, Gnarpe H, Laurila A. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in patients with chronic pharyngitis. *Scand J Infect Dis*. 1997; 29(6): 585-9.

[37] Falck G, Engstrand I, Gnarpe J, Gnarpe H. 1998. Association of *Chlamydia pneumoniae* with otitis media in children. *Scand J Infect Dis*, 30 (4): 377-380.

[38] Esposito S, Blasi F, Bosis S, Droghetti R, Faelli N, Lastrico A, Principi N. 2004. Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. *J Med Microbiol*, 53 (Pt 7): 645-651.

[39] Airene S, Surcel HM, Tuukkanen J, Leinonen M, Saikku P. 2002. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol*, 55 (4): 390-397.

[40] Öztürkcan S, Bakıcı MZ, Müderris S, Ungan M. 1998. Microbiology of tonsil surface and core in children with recurrent tonsillitis. *Turk Arch ORL*, 36 (1-2): 60-63.

[41] Lindroos R. 2000. Bacteriology of the tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hyperplasia-a short review. *Acta Otolaryngol Suppl*, 543: 206-267.

[42] Inci E, Karakullukcu B, Aygun G. 2002. Surface and core microflora of the tonsils in children undergoing tonsillectomy for recurrent tonsillitis. *Turkish Arc Otolaryngol*, 40 (4): 19-24.

[43] Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR, *C.pneumoniae* Workshop Participants. 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis*, 33 (4): 492-503.

[44] Kuo C, Campbell LA. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *J Infect Dis*, 181