

Kist Örneklerinde Yeni Bir Tek Tüp Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis*'in Saptanması

Detection of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* in Cyst Samples Using a Novel Single Tube Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction

Hüseyin CAN¹, Tonay İNCEBOZ², Ayşe CANER³, Esra ATALAY ŞAHAR³,
Muhammet KARAKAVUK³, Mert DÖŞKAYA³, Fehmi ÇELEBİ⁴, Aysu DEĞİRMENÇİ DÖŞKAYA³,
Sultan GÜLÇE İZ⁵, Yüksel GÜRÜZ³, Metin KORKMAZ³

¹ Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Science, Department of Biology, Molecular Biology Section, Izmir, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

⁴ Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Sakarya.

⁴ Sakarya University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Sakarya, Turkey.

⁵ Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

⁵ Ege University Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Izmir, Turkey

Geliş Tarihi (Received): 17.01.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.02.2016

ÖZ

Dünyada ve ülkemizde *Echinococcus granulosus* ve *Echinococcus multilocularis*'in neden olduğu sırasıyla kistik ekinokokkoz (KE) ve alveolar ekinokokkoz (AE) önemli helmint hastalıkları arasındadır. Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalar KE prevalansının 291-585/100.000 arasında olduğunu göstermiştir. AE seroprevalansının da %3.5 oranında olduğu bildirilmiştir. KE ve AE tanısında klinik bulgular yanında genelde radyoloji (ultrason, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans) ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Kesin tanı patolojik incelemeye dayalıdır. Hidatik kistlerin steril olması ya da protoskoleks içermemesi durumunda ise, patolojik tekniklerle *E.granulosus* ve *E.multilocularis* tür ayrımında zorluklar yaşanmaktadır. Bu çalışmada, aynı test içerisinde AE ve KE tanısının yapılmasına imkan verebilecek Echi S (5'-TTTATGAATATTGTGACCCCTGAGAT-3') ve Echi A (5'-GGTCTTAACCTCAACTCATG-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Mert Döşkaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 4734, **E-posta (E-mail):** mert.doskaya@ege.edu.tr

GAG-3') primerleri ve üç farklı prob; Anchor Ech (5'-GTTTGCCACCTCGATGTTGACTTAG-floresan-3'), Granulosus (5'-LC640-CTAAGGTTTTGGTGTAGTAATTGATATTTT-fosfat-3') ve Multilocularis (5'-LC705-CTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATT-fosfat-3') kullanılarak, *E.granulosus* ve *E.multilocularis* mitokondriyal 12S rRNA genini hedefleyen yeni bir multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (M-RT-PCR) yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. M-RT-PCR sırasında, *E.granulosus* (GenBank: AF297617.1) ve *E.multilocularis* (GenBank: NC_000928.2) mitokondriyal 12S rRNA gen bölgelerini içeren plazmidler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M-RT-PCR yönteminin geliştirilmesinde ayrıca, patolojik olarak KE (n: 10) ve AE (n: 15) olduğu doğrulanmış hastalara ait kist örneklerinin yanı sıra, negatif kontrol olarak sağlıklı insan DNA örnekleri (n: 25) ve 12 farklı parazite (*Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Fasciola hepatica*, *Enterobius vermicularis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Strongyloides stercoralis*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*) ait DNA örnekleri de çalışılmıştır. Testin analitik duyarlılığının saptanması için TOPO klonlama ile *E.granulosus* ve *E.multilocularis* pozitif kontrol plazmidleri oluşturulmuştur. Pozitif kontrol plazmidi, analitik duyarlılık ve özgüllüğün belirlenmesi amacıyla her reaksiyonda 10^2 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 -1 plazmid kopya olacak şekilde distile su ile sulandırılmıştır. Çalışmamızın sonuçları, testin pozitif kontrol plazmidi kullanılarak elde edilen analitik duyarlılığının, *E.granulosus* ve *E.multilocularis* için 1 plazmid kopya/µl örnek olduğunu göstermiştir. Testin 12 farklı parazite ait DNA örneği ile çapraz reaksiyon vermemesi, analitik özgüllüğünü ortaya koymuştur. Yirmibeş hastaya ait kist örneğinde *Echinococcus* DNA varlığının gösterilmesi ve tür ayırımının yapılabilmesinin yanında, sağlıklı (negatif kontrol) insan DNA örnekleri ile çapraz reaksiyon vermemesi, testin klinik duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen M-RT-PCR yönteminin, kist örneklerinde ekinokokkoz tanısının konulmasına ek olarak, *E.granulosus* ve *E.multilocularis*'in ayırt edilmesinde duyarlı, özgül, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Echinococcus granulosus*; *Echinococcus multilocularis*; multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; mitokondriyal 12S rRNA.

ABSTRACT

Cystic echinococcosis (CE) and alveolar echinococcosis (AE) caused by *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*, respectively, are important helminthic diseases worldwide as well as in our country. Epidemiological studies conducted in Turkey showed that the prevalence of CE is 291-585/100.000. It has also been showed that the seroprevalence of AE is 3.5%. For the diagnosis of CE and AE, radiological (ultrasonography, computed tomography, magnetic resonance) and serological methods, in addition to clinical findings, are being used. The definitive diagnosis relies on pathological examination When the hydatid cysts are sterile or does not contain protoscolex, problems may occur during pathological discrimination of *E.granulosus* and *E.multilocularis* species. In this study, we aimed to develop a novel multiplex real-time polymerase chain reaction (M-RT-PCR) targeting mitochondrial 12S rRNA gene of *E.granulosus* and *E.multilocularis* using Echi S (5'-TTTATGAATATTGTGACCCTGAGAT-3') and Echi A (5'-GGTCTTAACTCAACTCATGGAG-3') primers and three different probes; Anchor Ech (5'-GTTTGCCACCTCGATGTTGACTTAG-fluorescein-3'), Granulosus (5'-LC640-CTAAGGTTTTGGTGTAGTAATTGATATTTT-phosphate-3') and Multilocularis (5'-LC705-CTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATT-phosphate-3') that will enable the diagnosis of CE and AE in same assay. During M-RT-PCR, plasmids containing *E.granulosus* (GenBank: AF297617.1) and *E.multilocularis* (GenBank: NC_000928.2) mitochondrial 12S rRNA regions were used as positive controls. Cysts samples of patients which were pathologically confirmed to be CE (n: 10) and AE (n: 15) and healthy human DNA samples (n: 25) as negative control as well as DNA samples of 12 different parasites (*Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Fasciola hepatica*, *Enterobius vermicularis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Strongyloides stercoralis*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*) were used to develop M-RT-PCR. *E.granulosus* and

E.multilocularis control plasmids were constructed to detect analytic sensitivity of the test using TOPO cloning. Positive control plasmids were diluted to determine analytical sensitivity and specificity by distilled water at 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 -1 plasmid copy of dilution in each reaction. According to the results, analytical sensitivity of the assay for *E.granulosus* and *E.multilocularis* was 1 copy plasmid/ μ l reaction. The non-existence of cross reactivity with 12 different parasites' DNA samples showed the analytical specificity of the assay. Displaying *Echinococcus* DNA in cyst samples among 25 patients and species discrimination as well as non-existence of cross reactivity with human DNA samples showed that the clinical sensitivity and specificity of the assay were 100%. As a result, the M-RT-PCR developed in the present study provided a sensitive, specific, rapid, and reliable method in the diagnosis of echinococcosis and the discrimination of *E.granulosus* and *E.multilocularis* from cyst samples.

Keywords: *Echinococcus granulosus*; *Echinococcus multilocularis*; multiplex real-time polymerase chain reaction; mitochondrial 12S rRNA.

GİRİŞ

Echinococcus türlerinin neden olduğu ekinokokkoz, dünya genelinde en önemli helmint hastalıklarından biridir. Son yapılan taksonomik düzenlemede, *Echinococcus* cinsinin dokuz farklı türü olduğu kabul edilmiştir¹. Bu türler arasında, *Echinococcus granulosus*, *E.equinus*, *E.felidis*, *E.canadensis* ve *E.ortleppi* kistik ekinokokkoza (KE); *E.multilocularis* ise alveolar ekinokokkoza (AE) neden olmaktadır. *E.oligarthus* ve *E.vogeli*'nin polikistik ekinokokkoza (PE) yol açtığı, *E.shiquicus* kistlerinin de PE ve KE ile benzerlik gösterdiği fakat henüz kesin bir zoonotik statüsünün olmadığı rapor edilmiştir². Moleküler epidemiyolojik yöntemlerle *E.granulosus* türü içerisinde 10 farklı genotip (G1-G10) tanımlanmıştır³. Bu genotipler arasında bazıları tür olarak değerlendirilerek G1-G3 *E.granulosus sensu stricto*, G4 ve G5 sırasıyla, *E.equinus* ve *E.ortleppi* ve G6-G10 *E.canadensis* olarak isimlendirilmiştir⁴. İnsan ve hayvanlar için en önemli ve yaygın olarak saptanan türlerin, *E.granulosus sensu stricto* ve *E.multilocularis* olduğu bildirilmiştir⁵. Türkiye'de koyun suşu olarak adlandırılan G1 genotipi, insan dahil olmak üzere farklı hayvan türlerinde de saptanmıştır⁶.

Yurdumuzda, *E.granulosus* kaynaklı KE hemen hemen bütün bölgelerde görülürken, *E.multilocularis*'in etkeni olduğu AE sıklıkla Doğu Anadolu'da görülmektedir⁷. Türkiye'de insanlarda KE prevalansının genellikle cerrahi olgu kayıtlarından elde edildiği ve bu sonuçlara bağlı olarak 0.8-2/100.000 arasında olduğu bildirilmiştir⁸. KE prevalansını araştırılan epidemiyolojik çalışmalarda da, prevalansın 291-585/100.000 arasında olduğu rapor edilmiştir⁷. Türkiye'de, T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1975-1994 yılları arasında 40.242 olgu saptanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada ise, 1990-2005 yılları arasında 52.124 insan KE olgusu tespit edilmiştir. *E.granulosus* için kesin konak olan köpeklerde de prevalansın %0.32-%40 arasında olduğu bulunmuştur⁷⁻⁹. Türkiye'de insanlarda görülen AE olgularına bakıldığında, 2000-2010 yılları arasında 162 AE olgusu tespit edilmiş; *E.multilocularis* antikor seroprevalansı ise %3.5 oranında saptanmıştır¹⁰. Türkiye'de *E.multilocularis* için ana konak olan tilkilerde de *E.multilocularis* saptandığı bildirilmiştir¹¹.

KE ve AE tanısında, klinik bulgular, radyoloji (ultrason, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans) ve ELISA ile Western Blot gibi serolojik yöntemler, cerrahi tedavi öncesinde

kullanılmaktadır¹²⁻¹⁵. Kesin tanı genellikle patolojik/histolojik incelemeye dayalı olup, çıkartılan doku parçasına periyodik asit Schiff (PAS) boyası uygulanmaktadır¹⁶. Ancak bu yöntemin bazı kısıtlamaları mevcuttur. Bu kısıtlamalardan birisi, çoğu zaman *Echinococcus* spp. kistlerinin steril olması ya da protoskoleks içermemesi ve bu sebeple de *E.granulosus* ve *E.multilocularis* arasında tür ayrımının yapılamamasıdır¹⁶. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için geleneksel yöntemlere ek olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi *E.granulosus* ve *E.multilocularis* türlerinin saptanmasında kullanılmaktadır. PCR yöntemi sıklıkla drenaj ve biyopsi materyallerine uygulanmakta ve bu yöntem giderek ekinokokkoz tanısında doğrulayıcı bir tanı aracı olarak kabul görmektedir^{5,17}. PCR yöntemlerinde; mitokondriyal NADH dehidrogenaz 1 (ND1), ND5, sitokrom b, sitokrom c oksidaz alt ünite 1 (COX1) ve 12S rRNA gibi gen bölgeleri ekinokokkoz tanısında araştırılmaktadır^{2,5,16,18-20}. Bu çalışmada, aynı test içerisinde *E.granulosus* ve *E.multilocularis* saptanmasına olanak sağlayan mitokondriyal 12S rRNA genini hedefleyen yeni bir multipleks gerçek zamanlı PCR yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kist Örnekleri

Testin geliştirilmesinde, AE veya KE tanısı patolojik olarak doğrulanmış opere hastalara ait 25 adet kist materyali (10 adet *E.granulosus*, 15 adet *E.multilocularis*) kullanıldı. Negatif kontrol olarak sağlıklı 25 kişiye ait DNA örnekleri çalışıldı. Çalışma için, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan onay (13.07.2015 tarih ve 15-6.1/4 karar no) alındı.

TOPO Klonlama ile Pozitif Kontrol Plazmid Oluşturulması

E.granulosus (GenBank: AF297617.1) ve *E. multilocularis* (GenBank: NC_000928.2) mitokondriyal 12S rRNA geni içerisindeki 199 baz çift (bc)'lik kısmı içeren plazmid kontrollerin oluşturulmasında *E.granulosus* ve *E.multilocularis* pozitif kist materyalleri kullanıldı. Pozitif kontrol plazmid üretici firmanın (Invitrogen, ABD) protokolüne göre tarif edildiği gibi hazırlandı²¹.

Öncelikle *E.granulosus* mitokondriyal 12S rRNA ve *E.multilocularis* mitokondriyal 12S rRNA gen bölgeleri özgül primerler kullanılarak tarif edildiği gibi izole edildi^{17,22}. Kısaca; PCR reaksiyonunda genomik DNA (1-10 ng), her biri 0.5 µM primerler [*Echi* S (5'-TTTATGAATATTGTGACCCTGAGAT-3'; 25 nt) ve *Echi* A (5'-GGTCTTAACTCAACTCATGGAG-3'; 22 nt)], 1.25 U TaqDNA polimeraz (Fermentas, ABD), 0.2 mM dNTP ve 1 x TaqDNA polimeraz reaksiyon tamponu kullanılarak tarif edilen PCR protokolü ile izole edildi; 95°C'de 15 dk başlangıç denatürasyonu sonrası, 30 sn 95°C, 30 sn 55°C ve 30 sn 72°C'lik 40 döngü ve son uzama basamağı 72°C'de 5 dk uygulandı. Her bir PCR reaksiyonunun içerdiği DNA miktarı Nanodrop ile belirlendi ve daha sonra PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. PCR ürünü daha sonra PCR saflaştırma kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın protokolüne göre saflaştırıldı.

1 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 1 µl tuz solüsyonu, 1 µl pCRII-TOPO vektör ve 3 µl distile su karıştırılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında karışımdan 2 µl alınarak buz

üstünde DH5 α hücreleri ile karıştırılıp 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası karışıma 42°C'de ısı şoku uygulanmış ve 250 μ l SOC (süper optimal katobolizer) besiyeri eklenip 225 rpm'de 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, kanamisin içeren LB-Agar plaklara ekilerek 37°C'de 1 gün inkübe edildi. Oluşan kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak kanamisin içeren 3 ml'lik LB besiyerine aktarıldı ve 37°C'de 225 rpm ile 1 gün süresince inkübe edildi. Elde edilen sıvı kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapıldı. Plazmidler *E.granulosus* mitokondriyal 12S rRNA (GenBank no: AF297617) ve *E.multilocularis* mitokondriyal 12S rRNA (GenBank no: NC_000928) gen bölgelerini içeren pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol plazmidini, analitik duyarlılık ve özgüllüğün belirlenmesi amacıyla her reaksiyonda 10⁶-10⁵-10⁴-10³-10²-10¹ plazmid kopya olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Testte negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Klinik Örneklerden DNA İzolasyonu

Kist dokusu örneklerinden DNA ekstraksiyonu, kit ile üretici firmanın (Qiagen, Almanya) protokolü kullanılarak tarif edildiği gibi yapıldı. DNA ekstraksiyonu sırasında doku örneklerini içeren homojenattan 80 μ l (ortalama 25 μ g doku içerir) kullanıldı. Bu homojenat üzerine 180 μ l ATL tampon ve 20 μ l proteinaz K ilave edilerek iyice karıştırıldı ve 56°C'de dokular tamamen eriyene kadar inkübe edildi. Eritilmiş doku üzerine 200 μ l AL tampon ekledikten sonra iyice karıştırılıp 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası karışım içerisine 200 μ l etanol eklendi ve sonrasında bir kez daha iyice karıştırıldı. Elde edilen karışım, kollektör tüp üzerine oturtulmuş kite ait filtreye aktarılıp 8000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süzülen sıvıyı içeren kollektör tüp atıldı ve filtreli tüpler temiz bir başka kollektör tüp içine yerleştirildi. Bundan sonra filtreli tüplere 500 μ l AW1 yıkama tamponu ilave edilip, tekrar 8000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Filtreli tüpler santrifüj sonrası temiz kollektör tüplerin içine yerleştirildi ve üzerine 500 μ l AW2 yıkama tamponu ilave edildikten sonra 14000 x g'de 3 dk santrifüj edildi. Son olarak 14000 x g'de 1 dk daha santrifüj ile arta kalan yıkama tamponu uzaklaştırılıp filtreli tüp temiz bir 1.5 ml'lik ependorf içine yerleştirildi. Daha sonra 200 μ l elüsyon tamponu filtreli tüpe eklendi; 1 dk bekletildikten sonra tüpler 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra filtreli tüp atılarak, geride kalan DNA örneği PCR çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

Multipleks Gerçek Zamanlı PCR (M-RT-PCR)

Bu yöntemde, *E.granulosus* ve *E.multilocularis*'e ait mitokondriyal 12S rRNA geni içerisindeki 199 bç uzunluğundaki bölge hedeflendi. Hedef genin çoğaltılmasında Echi S (5'-TTTATGAATATTGTGACCCTGAGAT-3'; 25 nt) ve Echi A (5'-GGTCTTAACCTCAACTCATGGAG-3'; 22 nt) primerleri ve üç farklı prob; Anchor Ech (5'-GTTTGCCACCTCGATGTTGACTTAG-floresan-3'; 25 nt), Granulosus (5'-LC640-CTAAGGTTTTGGTGTAGTAATTGATATTT-fosfat-3'; 30 nt) ve Multilocularis (5'-LC705-CTGTGATCTTGGTGTAGTAGTTGAGATT-fosfat-3'; 28 nt) (TIB MolBiol, Almanya) kullanıldı. Bu reaksiyon için, LightCycler® Fast Start DNA Master HybProbe kiti, primer ve problar, Tablo I'de verildiği miktarlarda karıştırıldı. Örnekler 1.5 LightCycler Real Time cihazında, Tablo II'de tarif edilen nicelik (quantification) ve erime eğrisi (melting curve) analizleri uygulandı.

Tablo I. Gerçek zamanlı PCR testinde her örnek için kullanılan reaksiyon karışımı

Malzeme	Son hacim	Son konsantrasyon
Echi A, ileri primer (20 µM)	0.5 µl	0.5 µM
Echi S, geri primer (20 µM)	0.5 µl	0.5 µM
Anchor Ech, prob (20 µM)	0.1 µl	0.1 µM
Granulosus prob (20 µM)	0.2 µl	0.2 µM
Multilocularis prob (20 µM)	0.1 µl	0.1 µM
10 x FastStart karışımı ^a	2.0 µl	1x
25 mM MgCl ₂ ^b	2.4 µl	4 mM ^b
Distile su	9.2 µl	-
Kalıp DNA	5 µl	-
Toplam	20 µl	

^a FastStart karışımı, FastStart enzim (1a) ve FastStart Reaction Mix HybProbe (1b) tüplerinin karışımı ile oluşturulmuştur.
^b 25 mM MgCl₂ eklenmesi sonrası son konsantrasyonun 4 mM olması, 10 x FastStart karışımı içinde bulunan 10 mM son konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonundan kaynaklanmaktadır.

Tablo II. Gerçek zamanlı PCR testinde her bir örnek için kullanılan protokol

Analiz modu	Döngü sayısı	Basamak	Hedef sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma modu
Preinkübasyon						
-	1	-	95°C	10 dk	20	-
Amplifikasyon						
Kantifikasyon	40	Denatürasyon	95°C	10 sn	20	-
		Birleşme	51°C	10 sn	20	Tek
		Uzama	72°C	10 sn	20	-
Erime Eğrisi (Melting Curve)						
	1	Denatürasyon	95°C	20 sn	20	-
		Birleşme	40°C	20 sn	20	-
		Uzama	85°C	0 sn	0.2	Sürekli
Soğutma (Cooling)						
-	1		40°C	30 sn	20	-

Çapraz Reaksiyon Örnekleri

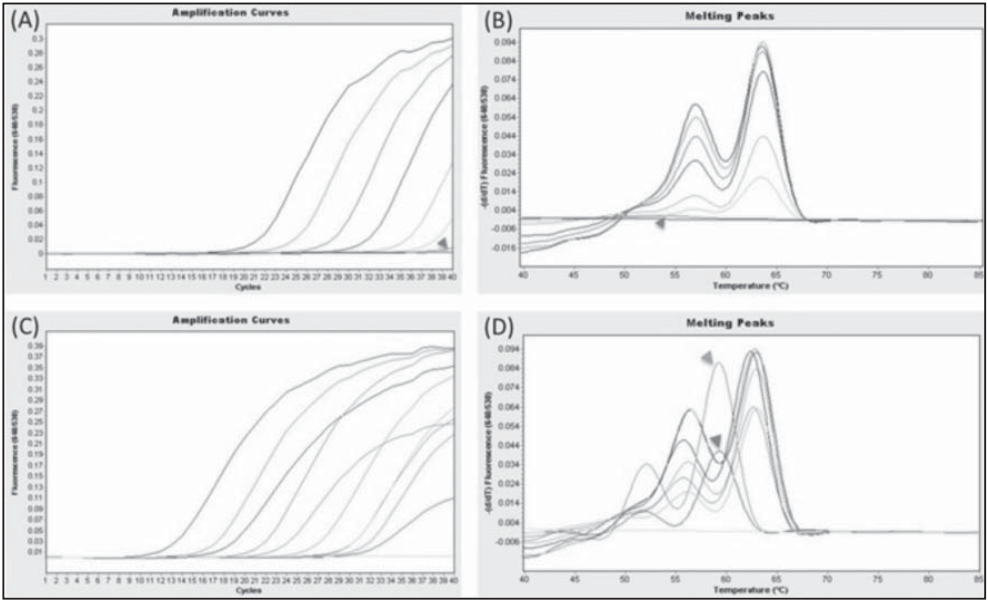
M-RT-PCR testinin analitik özgüllüğünün belirlenmesinde; 12 farklı parazit (*Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Fasciola hepatica*, *Enterobius vermicularis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Trichomonas vaginalis*, *Cryptosporidium hominis*, *Strongyloides stercoralis*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*) ve insan örneklerinden elde edilen DNA ekstraksiyon örnekleri kullanıldı.

BULGULAR

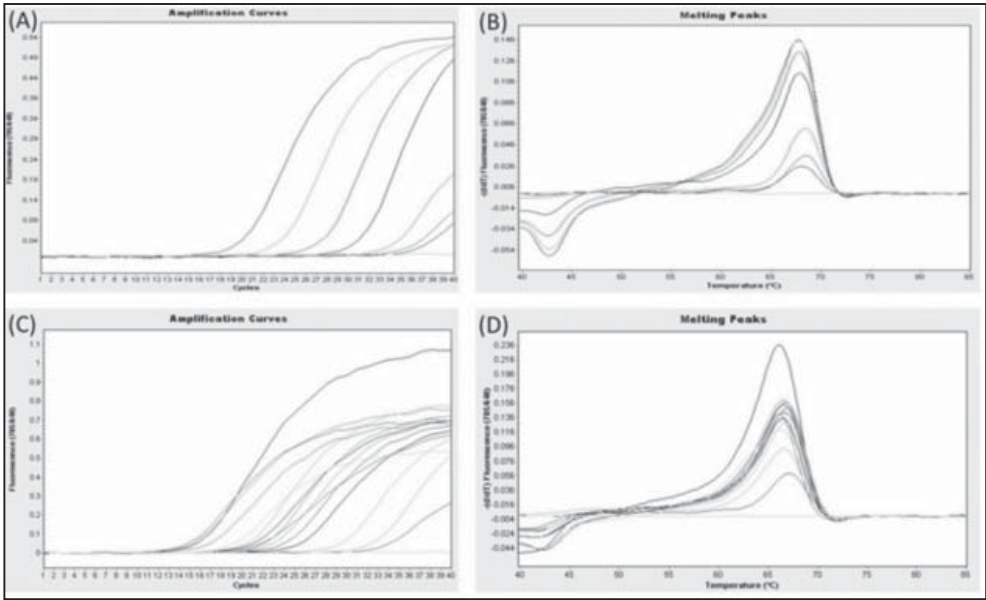
Analitik Duyarlılık

Testin analitik duyarlılığının saptanmasında, pozitif kontrol plazmidleri her reaksiyon 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 kopya plazmid olacak şekilde sulandırılmıştır. *E.granulosus* nicelik testinden elde edilen sonuçlar, pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 -1 arası dilüsyonda belirgin amplifikasyon eğrisi verdiğini 1 plazmid içeren örnekte düşük miktarda floresan ışımaya olduğunu göstermiştir (Şekil 1A, okbaşı). *E.granulosus* pozitif plazmid kontrol ve klinik örneklerle ait erime eğrisi analizi sonuçları incelendiğinde; 51 - 57°C ve 59 - 64°C arasında iki farklı Tm değeri gözlenmiştir (Şekil 1B ve 1D). Pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 dilüsyonda benzer erime eğrisi verdiği, 1 plazmid içeren örnekte düşük miktarda ışımaya olduğu saptanmıştır (Şekil 1B, okbaşı). Distile su negatif kontrol örneğinde herhangi bir ışımaya saptanmamıştır. Bu sonuçlar, *E.granulosus* testinin saptama limitinin 1 kopya plazmid/ μl örnek olduğunu göstermiştir.

E.multilocularis sonuçları incelendiğinde; nicelik testinde pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 -1 arası dilüsyonlarda belirgin amplifikasyon eğrisi verdiği görülmüştür (Şekil 2A). *E.multilocularis* plazmid pozitif kontrol ve klinik örneklerle ait erime eğrisi analizi sonuçları incelendiğinde, Tm değerinin $67.3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 -1 arası dilüsyonlarda benzer erime eğrisi verdiği gözlenmiştir (Şekil 2B). Distile su negatif kontrol örneğinde herhangi bir ışımaya saptanmamıştır. Bu sonuçlar, *E.multilocularis* testinin saptama limitinin 1 kopya plazmid/ μl örnek olduğunu göstermiştir.



Şekil 1. *E.granulosus* pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 dilüsyon aralığında (A) nicelik ve (B) erime eğrisi analizi sonuçları. *E.granulosus* klinik örneklerinin (n: 10) (C) nicelik ve (D) erime eğrisi analizi sonuçları.



Şekil 2. *E. multilocularis* pozitif kontrol plazmid örneklerinin 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 dilüsyon aralığında (A) nicelik ve (B) erime eğrisi analizi sonuçları. *E. multilocularis* klinik örneklerinin (n: 15) (C) nicelik ve (D) erime eğrisi analizi sonuçları.

Analitik Özgüllük

Çalışmada kullanılan primer ve problemlerin özgüllüğü, BLAST analizi ile National Center for Biotechnology Information web sitesi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak doğrulanmış ve önemli bir eşleşme görülmemiştir. Ayrıca 12 farklı parazite ait DNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen M-RT-PCR testinde çapraz reaksiyon saptanmamıştır.

Klinik Duyarlılık ve Özgüllük

M-RT-PCR testi geliştirilmesinde kullanılan 25 adet kist örneğinin 10'u *E. granulosus*, 15'i *E. multilocularis* saptanmış hastalara aittir. M-RT-PCR yönteminden elde edilen sonuçların nicelik analizi, her örnekte *Echinococcus* varlığını göstermiştir (Şekil 1C ve 2C). Erime eğrisi sonuçları, bu örneklerin 10'unun *E. granulosus* (Şekil 1D) ve 15'inin de *E. multilocularis* (Şekil 2D) olduğunu göstermiştir. AE hastalarında, kontrol plazmidlerinden ve hastalara ait kist örneklerinden elde edilen erime eğrisi analizi değerleri benzer bulunmuştur. KE hastalarına ait örneklerin erime eğrileri incelendiğinde; 8 örneğe ait erime eğrisi, pozitif kontrol plazmid erime eğrisine benzerken, iki örneğin erime eğrisi farklılık göstermiştir (Şekil 1D, okbaşı). Bunların farklı *E. granulosus* suşlarına ait olduğu düşünülmüştür. Ayrıca negatif kontrol olarak kullanılan insan DNA örneklerinin (n: 25) hepsi negatif saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, bu çalışmada geliştirilen M-RT-PCR yönteminin ekinokokkoz tanısında duyarlılık ve özgüllüğünün %100 olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Son zamanlarda, insanların da dahil olduğu ara konaklardan elde edilen kist materiyallerinde ve köpek ya da tilki gibi kesin konaklardan elde edilen dışkı örneklerinde ekinokokkoz tanısı için geleneksel yöntemlere ek olarak moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{5,17-19}. Bu yöntemler sayesinde ekinokokkoza neden olan *Echinococcus* türü kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen multipleks yaklaşım ile kombine edilmiş gerçek zamanlı PCR tekniği, zamandan tasarruf sağladığı, maliyeti düşürdüğü, duyarlılık ve özgüllüğü artırdığı ve kullanım kolaylığı sebebiyle tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca, kapalı tüp sisteminin kullanımı ile, moleküler tanıda önemli problemler arasında yer alan kontaminasyon riskinin azaltılması da bir diğer avantajdır. Buna ek olarak hibridizasyon probunun kullanılması ile elde edilen erime eğrisi analizi sonuçları, tür bazında ve hatta hedef gene bağlı aynı türün farklı suşları arasında da ayırım imkanı sağlayabilmektedir. Ayrıca, tedavi öncesi ve sonrasında parazite ait DNA miktar tayininin ölçümüne olanak vererek tedavi etkinliğinin değerlendirilmesine de yardımcı olmaktadır^{23,24}.

Bu çalışmada geliştirilen multipleks gerçek zamanlı PCR (M-RT-PCR) sayesinde, Türkiye'de ve dünyada, insanlarda ve hayvanlarda ciddi patolojilere neden olan ekinokokkoz tanısı sağlanırken, *E.granulosus* ve *E.multilocularis* ayrımı da aynı test içerisinde eş zamanlı olarak yapılabilmektedir. Ayrıca testin analitik duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi için TOPO klonlama ile pozitif kontrol plazmidleri oluşturulmuştur. Testin saptama limitinin, *E.granulosus* ve *E.multilocularis* için 1 kopya plazmid/µl örnek olduğu gösterilmiş ve 12 farklı parazit ile çapraz reaksiyon vermediği de belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, geliştirilen test, *E.granulosus* ve *E.multilocularis*'in sebep olduğu ekinokokkoz tanısını yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptayabilmektedir. Testte ayrıca, üç hibridizasyon probunun kullanılmasıyla gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonucuna göre, *E.granulosus* için iki farklı Tm değeri 51-57°C ve 59-64°C arasında değişirken, *E.multilocularis* için Tm değerinin $67.3 \pm 1.5^\circ\text{C}$ olduğu saptanmıştır. Erime ısıları değerlerinin farklı olması sayesinde de *E.granulosus* ve *E.multilocularis* aynı test içinde ayırt edilebilmiştir. Geliştirilen M-RT-PCR yöntemi, daha sonra *E.granulosus* ve *E.multilocularis* olduğu patolojik olarak gösterilmiş 25 örneğe ve negatif 25 insan DNA örneğine uygulanmış ve %100 duyarlılık ve özgüllükle ekinokokkoz tanısının yapıldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, patolojik olarak ayırımı yapılmış 25 kist örneğinin erime eğrisi analizi incelenerek 10'unun *E.granulosus* ve 15'inin *E.multilocularis* olduğu gösterilmiştir.

Georges ve arkadaşları¹⁷, karaciğer dışı yerleşimli iki ekinokokkoz olgusunun serolojik değerlendirmesinde, kesin sonuç alınamaması sebebiyle, kemik dokusu kaynaklı iki kist içeriğinde *E.granulosus* ve *E.multilocularis*'e ait mitokondriyal 12S rRNA genini konvansiyonel PCR kullanarak araştırmış ve her iki olgunun da AE olduğunu saptamışlardır. Yakın zamanda yapılan bir konvansiyonel multipleks PCR çalışmasında da, *E.granulosus*, *E.multilocularis* ve *E.shiquicus*'e ait sırasıyla ND1, ND5 ve COX1 genleri hedeflenmiştir⁵. Elde edilen bant büyüklükleri, testin özgüllüğünün, diğer parazitlere ait DNA'lar kullanıldığında %100 olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada, duyarlılığın araştırılması için protoskoleks ve yumurtadan elde edilen DNA örnekleri kullanılmış; duyarlılığın *E.granulosus* ve *E.shiquicus* için 20 pg

DNA, *E.multilocularis* için 10 pg DNA, *E.granulosus* için iki yumurta ve *E.multilocularis* için tek yumurta olduğu belirtilmiştir⁵. Schneider ve arkadaşlarının¹⁶ çalışmasında, histolojik olarak *E.granulosus* (n: 76) ve *E.multilocularis* (n: 4) saptanmış 80 hasta örneği, mitokondriyal ND1 genini hedefleyen konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak *E.granulosus* ve *E.multilocularis* türlerinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, kullanılan PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %85 ve %100 olduğunu göstermiştir¹⁶. Dybicz ve arkadaşları¹⁹ ise, hepatektomi yapılan KE şüpheli 47 hastaya ait örnekleri, direkt mikroskopi ve iki farklı mitokondriyal gen bölgesini (ND1 ve COX1) hedefleyen konvansiyonel PCR ile incelemişler; 27 örnekte (%57) direkt mikroskopi ile protoskoleks görürken, PCR ile 30 örnekte (%64) pozitiflik saptamışlardır. Arjantin’de yapılan başka bir çalışmada, bir hastadan alınan biyopsi örneği skoleks içermemesine rağmen kist morfolojisi sebebiyle ekinokokkoz ile ilişkilendirilmiş ve serolojik testler ile de ekinokokkoz tanısı doğrulanmıştır²⁰. Daha sonra aynı hastadan ameliyatla çıkartılan karaciğer örneğinin patoloji sonucu AE olarak bulunmuştur. Aynı örneğe iki farklı mitokondriyal DNA bölgesini (sitokrom b ve COX1) hedefleyen konvansiyonel PCR uygulanmış ve elde edilen sonuçlar, ilginç şekilde etkenin *E.multilocularis* değil, insanda PE oluşturan *E.vogeli* olduğunu göstermiştir²⁰. Bu çalışmalar ekinokokkoza neden olan türün belirlenmesi ve kist tipinin ortaya çıkarılmasında patoloji ve seroloji gibi geleneksel yöntemlere ek olarak moleküler yöntemlerin de kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Diğer taraftan, ekinokokkozun insanlara ve diğer hayvanlara bulaşmasında anahtar rol oynayan köpek ve tilkilere ait dışkı örneklerinde PCR yöntemi kullanılarak tanı konulmaktadır^{18,24}. Hayvanlara ait dışkı örneklerinde *E.multilocularis*’in moleküler yöntemlerle saptanması için yapılan bir çalışmada, *E.multilocularis* pozitif dışkı örneklerinde (n: 47) 12S rRNA genini hedefleyen multipleks gerçek zamanlı iki turlu (nested) PCR yöntemi geliştirilmiştir¹⁸. Bu testin duyarlılığının klasik iki turlu PCR’a göre %30-38 oranında daha yüksek olduğu bulunmuş; analitik duyarlılık ise 10 fg hedef DNA olarak saptanmıştır¹⁸. Aynı çalışmada, farklı konaklardan izole edilmiş *E.multilocularis* suşlarına erime eğrisi analizi uygulandığında farklı Tm değerleri elde edilmiş; köpek, tibet tilkisi ve kırmızı tilkiden izole edilen suşlara ait Tm değerleri sırasıyla 38°C, 44.8°C ve 56°C olarak tespit edilmiştir¹⁸. Oines ve arkadaşları²⁴, tilki dışkılarında *E.multilocularis* yumurtalarının saptanması için, mitokondriyal DNA’yı hedefleyen multipleks PCR ve üç farklı gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemini karşılaştırmışlar ve dışkıdan *E.multilocularis* tanısında RT-PCR yönteminin daha duyarlı olduğu bildirmişlerdir²⁴.

Gerçek zamanlı PCR işleminde amplifikasyon işlemine paralel olarak erime eğrisi analizi ile tür ayrımı yapılabilirken, farklı bir yaklaşıma sahip olan konvansiyonel PCR işlemi sonrası RFLP (restriction fragment length polymorphism) testi ile de tür ayrımı yapılabilmektedir. Şakalar ve arkadaşları²⁵, formaldehit ile tespit edilmiş parafine gömülü histolojik olarak ekinokokkoz tanısı almış 11 adet kist materyalini (10 adet KE, 1 adet AE) kullanarak PCR-RFLP yöntemiyle tür ayrımı yapmışlardır. İlk olarak kist materyallerine mitokondriyal gen bölgesini hedefleyen PCR yöntemi uygulanmış, sonrasında *Tsol*, *Mbol*, *Mbol* ve *Accl* restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR ürünleri kesilmiştir. İşlem son-

rası jelde yürütülen ürünlerden elde edilen sonuçlar, kullanılan restriksiyon enzimlerinin *E.granulosus* ve *E.multilocularis*'i birbirinden ayırdığını göstermiştir²⁵.

Kist örneklerinin yanı sıra serum ve idrar örneklerine de PCR yönteminin uygulanabileceği gösterilmiştir. Chaya ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında, 50 hastadan (25'i cerrahi ya da ultrason ile KE tanısı almış, 25'i negatif kontrol) serum ve idrar örneği; opere edilen 10 hastadan da kist sıvısı örnekleri alınmıştır. Kist sıvısı örneklerinin tümü (n: 10), antijen tespiti yapan ELISA ve NADH1 genini hedefleyen konvansiyonel PCR ile *E.granulosus* pozitif bulunmuştur. Ayrıca KE tanısı almış 25 hastaya ait serum örneklerinin beşinde PCR ile *E.granulosus* pozitifliği tespit edilmiştir. İlginç olarak, bu hastaların kistlerinin perfore olduğu bildirilmiştir. İdrar örneklerinin (n: 25) hiçbirinde ve kontrollere (n: 25) ait serum örneklerinde PCR ile pozitiflik saptanmamıştır²⁶. Araştırmacılar, çalışmanın sonunda, bozulmamış kiste sahip hastaların serum örneklerinde PCR yönteminin başarısız olduğunu, ancak perfore kisti olan hastaların serum örneklerinde PCR yöntemiyle ekinokokkoz tanısının yapılabileceğini ifade etmişlerdir²⁶.

Sonuç olarak, ekinokokkoz ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, gerek insanlarda tanı için gerekse hastalığın yayılmasında temel unsur olan köpek ve tilkilerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar için daha etkin PCR yöntemine ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu sebeple çeşitli PCR tekniklerinin geliştirilmesi devam etmektedir. Bu çalışmada geliştirilen M-RT-PCR testinin gösterdiği analitik ve klinik duyarlılık ve özgüllük değerleri, kist ve serumdan ekinokokkoz tanısını ve tür ayrımını eş zamanlı olarak yapabilecek bir yöntem olduğu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). Int J Parasitol 2013; 43(12-13): 1017-29.
2. Ma J, Wang H, Lin G, et al. Molecular identification of *Echinococcus* species from eastern and southern Qinghai, China, based on the mitochondrial *cox1* gene. Parasitol Res 2012; 111(1): 179-84.
3. Zhang T, Yang D, Zeng Z, et al. Genetic characterization of human-derived hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* sensu lato in Heilongjiang Province and the first report of G7 genotype of *E. canadensis* in humans in China. PLoS One 2014; 9(10): e109059.
4. Altıntaş N, Öztatlıcı M, Altıntaş N, Ünver A, Sakarya A. Molecular analysis of cattle isolates of *Echinococcus granulosus* in Manisa Province of Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19(3): 455-9.
5. Liu CN, Lou ZZ, Li L, et al. Discrimination between *E. granulosus* sensu stricto, *E. multilocularis* and *E. shiquicus* using a multiplex PCR assay. PLoS Negl Trop Dis 2015; 9(9): e0004084.
6. Utuk AE, Simsek S, Koroglu E, McManus DP. Molecular genetic characterization of different isolates of *Echinococcus granulosus* in east and southeast regions of Turkey. Acta Trop 2008; 107(2): 192-4.
7. Altıntaş N. Past to present: echinococcosis in Turkey. Acta Trop 2003; 85(2): 105-12.
8. Merdivenci A, Aydınlioğlu K. Hydatidosis (Hydatid Disease). Istanbul University, Cerrahpasa School of Medicine Publications, vol. 2972. 1982, Istanbul.
9. Snábel V, Altıntaş N, D'Amelio S, et al. Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. Parasitol Res 2009; 105(1): 145-54.
10. Miman O, Yazar S. Alveolar echinococcosis in Turkey: in the light of the literature. Türkiye Parazitoloj Derg 2012; 36(2): 116-20.

11. Merdivenci, A. Türkiye’de tilkide *Alveococcus multilocularis* olgusu ve yurdumuzda *Alveococcus* (alveolar kist)’in epidemiyolojisi ve epizootolojisi. Turk Hidatid Derg 1965; 1: 6-29.
12. Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Korkmaz M, et al. A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey. Acta Trop 2013; 128(3): 578-83.
13. Pektaş B, Altıntaş N, Akpolat N, Gottstein B. Evaluation of the diagnostic value of the ELISA tests developed by using EgHF, Em2 and EmI/3-10 antigens in the serological diagnosis of alveolar echinococcosis. Mikrobiyol Bul 2014; 48(3): 461-8.
14. Güreşer AS, Özcan O, Özünel L, Boyacıoğlu Zİ, Taylan Özkan A. Evaluation of the radiological, biochemical and serological parameters of patients prediagnosed as cystic echinococcosis in Çorum, Turkey. Mikrobiyol Bul 2015; 49(2): 231-9.
15. Korkmaz M, Inceboz T, Celebi F, Babaoglu A, Uner A. Use of two sensitive and specific immunoblot markers, em70 and em90, for diagnosis of alveolar echinococcosis. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3350-2.
16. Schneider R, Gollackner B, Edel B, et al. Development of a new PCR protocol for the detection of species and genotypes (strains) of *Echinococcus* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Int J Parasitol 2008; 38(8-9): 1065-71.
17. Georges S, Villard O, Filisetti D, et al. Usefulness of PCR analysis for diagnosis of alveolar echinococcosis with unusual localizations: two case studies. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5954-6.
18. Dinkel A, Kern S, Brinker A, et al. A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of *Echinococcus multilocularis* and host species. Parasitol Res 2011; 109(2): 493-8.
19. Dybicz M, Gierczak A, Dabrowska J, Rdzanek L, Michałowicz B. Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland. Parasitol Int 2013; 62(4): 364-7.
20. Grenouillet F, Frider B, Alvarez Rodriguez J, et al. Molecular diagnosis of polycystic echinococcosis due to *Echinococcus vogeli* in a Paraguayan immigrant in Argentina. J Clin Microbiol 2013; 51(9): 3151-3.
21. Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, et al. A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 54(3): 169-75.
22. Stefanic S, Shaikenov BS, Deplazes P, Dinkel A, Torgerson PR, Mathis A. Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* (“sheep strain”) in naturally infected dogs. Parasitol Res 2004; 92(4): 347-51.
23. Döşkaya M, Caner A, Degirmenci A, et al. Degree and frequency of inhibition in a routine real-time PCR detecting *Pneumocystis jirovecii* for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in Turkey. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 7): 937-44.
24. Oines O, Isaksson M, Hagström Å, Tavorpanich S, Davidson RK. Laboratory assessment of sensitive molecular tools for detection of low levels of *Echinococcus multilocularis*-eggs in fox (*Vulpes vulpes*) faeces. Parasit Vectors 2014; 7: 246.
25. Şakalar Ç, Kuk S, Erensoy A, et al. Molecular discrimination of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* by sequencing and a new PCR-RFLP method with the potential use for other *Echinococcus* species. Turk J Med Sci 2014; 44(5): 741-8.
26. Chaya D, Parija SC. Performance of polymerase chain reaction for the diagnosis of cystic echinococcosis using serum, urine, and cyst fluid samples. Trop Parasitol 2014; 4(1): 43-6.