

Plasmodium spp.'nin Saptanmasında Multipleks Nested PCR, In-house Gerçek Zamanlı PCR ve Ticari Gerçek Zamanlı PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Multiplex Nested PCR, In-house Real-Time PCR and Commercial Real-Time PCR Methods for the Detection of *Plasmodium* spp. from Blood Samples

Selma USLUCA¹(ID), Bekir ÇELEBİ²(ID)

¹ T.C. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratories and Biological Products, Ankara, Turkey.

² T.C. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara.

² General Directorate of Public Health, Department of Zoonotic and Vector-borne Diseases, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Usluca S, Çelebi B. *Plasmodium* spp.'nin saptanmasında multipleks nested PCR, in-house gerçek zamanlı PCR ve ticari gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(2):306-317.

ÖZ

Sıtma, *Plasmodium* cinsi parazitlerin etken olduğu yaşamı tehdit edebilen paraziter bir hastalıktır. Gi- emsa boyalı kan yaymasının mikroskopik incelemesi tanıda altın standart yöntem olarak kabul edilmek- tedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu olan sıtmanın laboratuvar tanısını güçlendirebilmek için birden fazla yöntemle bir arada kullanılması önerilmektedir. Bu çalışmada, üç farklı moleküler yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması ve uygulanacak tanı algoritmasında hangi moleküler yöntemin kullanılacağına belirlenmesi amaçlanmıştır. Sıtma şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen 280 adet EDTA'lı tüpte saklanan tam kan örneğine ticari kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA örneklerinde *Plasmodium* spp.'nin saptanmasında üç farklı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. İlk olarak multipleks nested PCR, ardından da laboratu- varımızda doğrulanmış olan in-house gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ve ticari bir kit ile Rt-PCR yöntemleri uygulanmıştır. Multipleks nested PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmiş ve *Plasmodium* spp. açısından pozitif olarak değerlendirilen 182 örnek ile, negatif olarak değerlendirilen 98 örnek, in-house ve ticari Rt-PCR yöntemleriyle de çalışılmıştır. Multipleks nested PCR yönteminin birinci basamak reaksiyo- nunda *Plasmodium* spp. pozitif örneklerde 1670 baz çifti (bp), ikinci basamak reaksiyonunda *Plasmodium vivax* pozitif örneklerde 117 bp bant gözlenmiştir. In-house Rt-PCR'de erime eğrisi analizi ile *P.vivax* pozitif örneklerin Tm değerleri 78-79 olarak belirlenmiştir. In-house Rt-PCR yöntemi ile pozitif örneklerin CT değerleri 20.03-31.71 arasında, ticari Rt-PCR yöntemi ile pozitif örneklerin CT değerleri ise 17.26-34.94

İletişim (Correspondence): Dr. Selma Usluca, T.C. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 505 253 7123, E-posta (E-mail): selmausluca@gmail.com

arasında saptanmıştır. In-house Rt-PCR yöntemi ile olguların 180'i, ticari Rt-PCR yöntemi ile olguların 178'i pozitif olarak belirlenmiştir. In-house Rt-PCR ile 2 örnek, ticari Rt-PCR ile 4 örnek yalnızca negatif olarak değerlendirilmiştir. Her iki yöntemin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandığında in-house Rt-PCR yönteminin duyarlılığı 0.98, özgüllüğü 0.97, pozitif prediktif değeri (PPD) %98, negatif prediktif değeri (NPD) %97 olarak, ticari Rt-PCR yönteminin duyarlılığı 0.97, özgüllüğü 0.95, PPD %97, NPD %95 olarak belirlenmiştir. In-house ve ticari Rt-PCR yöntemleri arasında yüksek düzeyde uyum (κ : 0.953) belirlenmiştir. Bir testin doğrulama testi olarak kabul edilmesi için özgüllüğünün yüksek olması gereklidir. Çalışmamızın sonucunda in-house Rt-PCR yönteminin saptanan duyarlılık ve özgüllüğünün *Plasmodium* türlerinin laboratuvar tanısında yöntemin kullanımına uygun olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Sıtma*; *Plasmodium spp.*; *multipleks nested PCR*; *gerçek zamanlı PCR*.

ABSTRACT

Malaria is a life-threatening parasitic disease caused by the parasites belonging to *Plasmodium* genus. Microscopic examination of Giemsa stained blood smears is accepted as the gold standard diagnostic method. It is recommended to use more than one method in order to strengthen the laboratory diagnosis of malaria which is an important health problem in our country as in the whole world. In this study, it was aimed to compare the results of three different molecular methods and determine which molecular method could be used in the diagnostic algorithm to be applied. DNA was extracted from 280 whole blood sample stored in EDTA tubes using a commercial kit. Three different polymerase chain reaction (PCR) methods were used for the detection of *Plasmodium* spp. in DNA samples obtained and the results were compared. First, multiplex nested PCR was applied and then in-house real-time PCR (Rt-PCR) which was validated in our laboratory and a commercial Rt-PCR kit were applied. Multiplex nested PCR was accepted as the gold standard and 182 samples that were evaluated as *Plasmodium* spp. positive and 98 samples that were evaluated as negative were also studied by in-house and commercial Rt-PCR methods. In multiplex nested PCR's first step reaction 1670 base pairs (bp) band was observed in *Plasmodium* spp. positive samples and 117 bp band was observed in *Plasmodium vivax* positive samples in the second step reaction. Tm values of *P.vivax* positive samples were determined as 78-79 in the melting analysis of the in-house Rt-PCR. CT values of the positive samples in in-house Rt-PCR were between 20.03-31.71 and were between 17.26-34.94 in the commercial Rt-PCR. With the in-house Rt-PCR method 180 cases were determined as positive, while with the commercial Rt-PCR method 178 cases were determined as positive. Two samples with the in-house Rt-PCR and 4 samples with the commercial Rt-PCR were considered as false negative. When the sensitivity and specificity of the both methods were calculated, the sensitivity of the in-house Rt-PCR method was 0.98, the specificity was 0.97, the positive predictive value (PPV) was 98%, the negative predictive value (NPV) was 97%, the sensitivity of the commercial Rt-PCR was 0.97, the specificity was 0.95, the PPV was 97%, the NPV was 95%. A high level of agreement (κ : 0.953) was determined between the in-house and the commercial Rt-PCR methods. In order for a test to be accepted as a confirmatory test, its specificity must be high. It was decided that sensitivity and specificity of the in-house Rt-PCR were suitable for using this method in the laboratory diagnosis of *Plasmodium* species.

Keywords: *Malaria*; *Plasmodium spp.*; *multiplex nested PCR*; *real-time PCR*.

GİRİŞ

Sıtma, *Plasmodium* cinsi parazitlerin etken olduğu yaşamı tehdit edebilen paraziter bir hastalıktır. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* olmak üzere insanı enfekte eden beş türü bilinmektedir. *P.falciparum* en yüksek mortalite oranına neden olan tür iken, *P.vivax* düşük mortaliteye yol açmakta ve ılımlı bir klinik seyir gözlenmektedir¹. *P.vivax* ve *P.ovale* türleri kronik karaciğer evresi (hipnozoit) oluşturabilmekte ve nüks enfeksiyona neden olabilmektedirler². Ülkemizde görülebilen etken tür *P.vivax* olmakla birlikte diğer türler ile yurt dışı

kaynaklı sporadik olgular da bildirilmektedir^{1,3}. Türkiye 1957 yılında "Ulusal Sıtma Eradikasyonu Programı"na dahil edilmiş ve ciddi bir sıtma ile savaş programı uygulanmıştır. 1983 yılında eradikasyon programı "Sıtma Kontrol Programı" olarak değiştirilmiş, 2006 yılında da ülkemiz eliminasyon programına dahil edilmiştir⁴.

Aralarında ülkemizin de bulunduğu 16 ülkede (Arjantin, Ermenistan, Azerbaycan, Kosta Rika, Irak, Gürcistan, Kırgızistan, Fas, Umman, Paraguay, Sri Lanka, Tacikistan, Türkmenistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Özbekistan) 2014 yılında sıfır yerli olgu bildirilmiştir⁵.

Giemsa boyalı kan yaymalarının mikroskopik incelemesi sıtma tanısında halen altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu yöntemin kısıtlılığı, hazırlanan preparatın ve boyamanın kalitesi, değerlendirme süresi gibi birçok faktöre bağlı olarak tecrübeli laboratuvar personeli tarafından uygulandığında bile tanının atlanabilmesidir. Artan ilaç direncine karşılık daha pahalı antimalaryal kombinasyon tedavileri uygulandığı için hızlı ve doğru tanı araçlarına duyulan gereksinim giderek daha fazla önem kazanmaktadır⁶.

Sıtma ülkemizde elimine edilmiş olmakla birlikte, hastalığın endemik olarak görüldüğü bir coğrafi bölgede yer alması ve son yıllarda diğer endemik bölgelerden çok sayıda göç alması nedeniyle laboratuvar tanısını güçlendirebilmek için birden fazla yöntemin bir arada kullanılması önerilmektedir. Özellikle tanı problemi yaşanan düşük parazitemi oranına sahip olan veya kliniği sıtmayı düşündüren olgularda tanının doğrulanması gerekmektedir. Moleküler yöntemler bu gibi olgularda tanıya önemli katkı sağlamakla birlikte, duyarlılık ve özgüllükleri farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, üç farklı moleküler yöntemin karşılaştırılması ve elde edilen sonuçlara dayanarak uygun olan yöntemin belirlenerek laboratuvarımıza sıtma şüphesi ile gelen kan örneklerine uygulanacak tanı algoritmasında hangi moleküler yöntemin kullanılacağı belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.01.2020 ve Karar no: 158/2019).

Sıtma şüphesiyle Ağustos 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında Mardin ili Savur ilçesine bağlı Başkavak köyünden hastalığın tanısının doğrulanması amacıyla laboratuvarımıza gönderilen, mikroskopik olarak 182'si pozitif, 98'i negatif olmak üzere toplam 280 adet EDTA'lı tüpte saklanan tam kan örneğine ticari kit (QiAmp DNA Blood Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu uygulandı. Elde edilen DNA örneklerinde *Plasmodium* spp.'nin saptanması için 3 farklı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanıldı ve sonuçları karşılaştırıldı. İlk olarak Singh ve arkadaşlarının⁷ bildirdiği *Plasmodium* cinsine özgü rPLU1, rPLU5 primerleri ve türe özgü rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerleri kullanılarak multipleks nested PCR yöntemleri uygulandı. Ardından laboratuvarımızda doğrulanmış bir yöntem olarak Mangold ve arkadaşlarının⁸ bildirdiği PL1473F18, PL1679R18

primerleri kullanılarak in-house gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ve ticari kit (Genesig, Primer Design, İngiltere) ile *Plasmodium* spp. primerleri (18S ribosomal RNA geni) kullanılarak tüm örnekler Rt-PCR yöntemi uygulandı. Ticari Rt-PCR yöntemi ile *Plasmodium* spp. pozitif sonuç elde edilen örnekler üretici firmanın önerileri doğrultusunda her bir *Plasmodium* alt türüne yönelik ticari kit ile (Genesig, Primer Design, İngiltere) PCR amplifikasyonu uygulandı. Multipleks nested PCR ve in-house Rt-PCR'de kullanılan primer dizileri Tablo I'de gösterilmiştir.

Multipleks nested PCR'nin birinci basamak amplifikasyonu için 50 µl toplam hacim içerisinde 5 µl DNA olacak şekilde karışım oranları; 5 µl Hotstart Taq tampon çözeltisi (Thermo Scientific, ABD), 4 µl MgCl₂ (Thermo Scientific, ABD), 1 µl dNTP (Thermo Scientific, ABD), birer µl (10 pmol) rPLU1 ve rPLU5 primerleri (Metabion, Almanya), 0.25 µl Hotstart Taq DNA polimeraz enzimi (Thermo Scientific, ABD), 37.5 µl distile su içerecek şekilde hazırlandı. İkinci basamak PCR amplifikasyonu için 20 µl toplam hacim içerisinde 2 µl ampikon olacak şekilde karışım oranları; 2 µl Hotstart Taq tampon çözeltisi (Thermo Scientific, ABD), 3 µl MgCl₂ (Thermo Scientific, ABD), 0.5 µl dNTP (Thermo Scientific, ABD), 0.5'er µl (10 pmol) rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerleri (Metabion, Almanya), 0.1 µl Hotstart Taq DNA polimeraz enzimi (Thermo Scientific, ABD) içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 30 saniye, 52°C 1 dakika, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü, 72°C 5 dakika son uzama şeklinde birinci basamak reaksiyon, 94°C'de 4 dakika başlangıç denatürasyonu, 94°C 30 saniye, 55°C 1 dakika, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü, 72°C 5 dakika son uzama şeklinde ayarlanarak ikinci basamak reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen amplifikasyon ürünleri %1.5 agaroz jelde görüntülendi.

Tablo I. Multipleks Nested PCR ve In-house Rt-PCR Yöntemlerinde Kullanılan Primer Dizileri

Primer adı	Primer dizisi
rPLU1	5'-TCA AAG AT TAA GCC ATG CAA GTG A-3'
rPLU5	5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'
r VIV 1	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'
r VIV 2	5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'
r fAL 1	5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'
r fAL 2	5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'
r mal 1	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'
r mal 2	5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'
r OVA1	5'- ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA-3'
r OVA2	5'-GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA ATG-3'
PL1473 F	5'-TAA CGA ACG AGA TCT TAA-3'
PL1679 R	5'-GTT CCT CTA AGA AGC TTT-3'

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Çalışmada pozitif kontrol örneği olarak, laboratuvarın katılım sağladığı bir dış kalite kontrol programına ait örnekler kullanıldı. *P.vivax* pozitif kontrol örneğinde 117 baz çifti (bp), *P.falciparum* pozitif kontrol örneğinde 205 bp, *P.malariae* pozitif kontrol örneğinde 144 bp, *P.ovale* pozitif kontrol örneğinde 787 bp bant gözlemlendi. Laboratuvarımızda mikroskopi ve PCR ile *P.vivax* pozitif olarak saptanan ve dizi analizi yapılan bir kan örneğinden ticari kit ile (QIAmp DNA mini blood kit, Qiagen, Almanya) DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen DNA örneği plazmite klonlandıktan sonra plazmit ekstraksiyonu yapılarak DNA ölçümü gerçekleştirildi. Bu DNA örneğinden 1/10 oranında hazırlanan seri dilüsyonlarla saptama limiti çalışması yapıldı.

In-house Rt-PCR amplifikasyonu için 20 µl toplam hacim içerisinde 2 µl DNA olacak şekilde karışım oranları; 10 µl EvaGreen mastermix (Biotium, ABD), birer µl (10 pmol) PL1473F18 ve PL1679R18 primerleri (Metabion, Almanya), 6 µl distile su olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 10 saniye, 50°C 30 saniye, 72°C 20 saniye olmak üzere 40 döngü şeklinde düzenlenerek gerçekleştirildi. Erime eğrisi analizi 68-95°C arasında değerlendirildi.

Ticari kit (Genesig, Primer Design, İngiltere) ile *Plasmodium* spp. primerleri kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda Rt-PCR yöntemi uygulandı. In-house ve ticari Rt-PCR yöntemleri arasındaki uyumu istatistiksel olarak değerlendirmek için kapp testi kullanıldı.

BULGULAR

DNA ölçümü sonucunda plazmit DNA konsantrasyonu 57 ng/µl (2.4×10^{10} kopya) olarak belirlenmiştir. Bu örnekten hazırlanan seri dilüsyonlarla çalışılan Rt-PCR yönteminde saptama limiti 10⁻⁹ (reaksiyonda 24 kopya) olarak tespit edilmiştir.

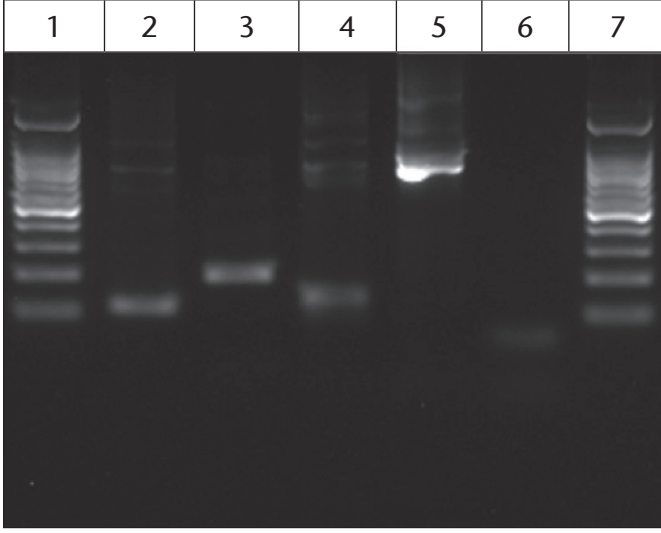
Multipleks nested PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmiş ve *Plasmodium* spp. açısından pozitif olarak değerlendirilen 182 örnek ile, negatif olarak değerlendirilen 98 örnek, ticari ve in-house Rt-PCR yöntemleriyle de çalışılmıştır. Pozitif olarak belirlenen örneklerin tümü *P.vivax* olup, mikst enfeksiyon saptanmamıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo II'de verilmiştir.

Multipleks nested PCR ile birinci basamak reaksiyonda *Plasmodium* spp. pozitif örneklerde 1670 bp büyüklüğünde, ikinci basamak reaksiyonda *P.vivax* pozitif örneklerde 117 bp büyüklüğünde bant gözlenmiştir. İkinci basamak reaksiyonda *Plasmodium* türlerine ait pozitif örnekler Resim 1'de gösterilmiştir.

Tablo II. Multipleks Nested PCR, Ticari Rt-PCR ve In-house Rt-PCR Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları

Test sonucu	Ticari Rt-PCR	In-house Rt-PCR	Multipleks Nested PCR
Pozitif	178	180	182
Negatif	102	100	98
Toplam	280	280	280

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.



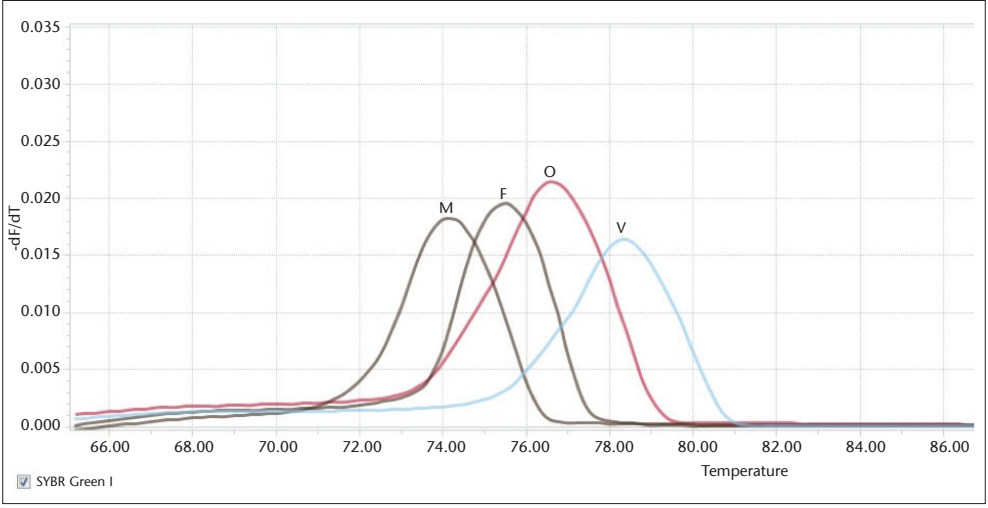
Resim 1. Multipleks nested PCR amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü. 1: 100 bp moleküler ağırlık belirteci. 2: *P.vivax* pozitif örnek (117 bp). 3: *P.falciparum* pozitif örnek (205 bp). 4: *P.malariae* pozitif örnek (144 bp). 5: *P.ovale* pozitif örnek (787 bp). 6: Negatif kontrol. 7: 100 bp moleküler ağırlık belirteci.

Buna göre *P.vivax* pozitif örnekte 117 bp, *P.falciparum* pozitif örnekte 205 bp, *P.malariae* pozitif örnekte 144 bp, *P.ovale* pozitif örnekte 787 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. In-house Rt-PCR'de pozitif örnekler erime eğrisi analizi ile değerlendirilmiştir. *P.vivax* pozitif kontrol örneğinin Tm değerleri 78-79, *P.falciparum* pozitif kontrol örneğinin Tm değerleri 75-75.5, *P.malariae* pozitif kontrol örneğinin Tm değerleri 74-74.5, *P.ovale* pozitif kontrol örneğinin Tm değerleri 76.5-77 olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

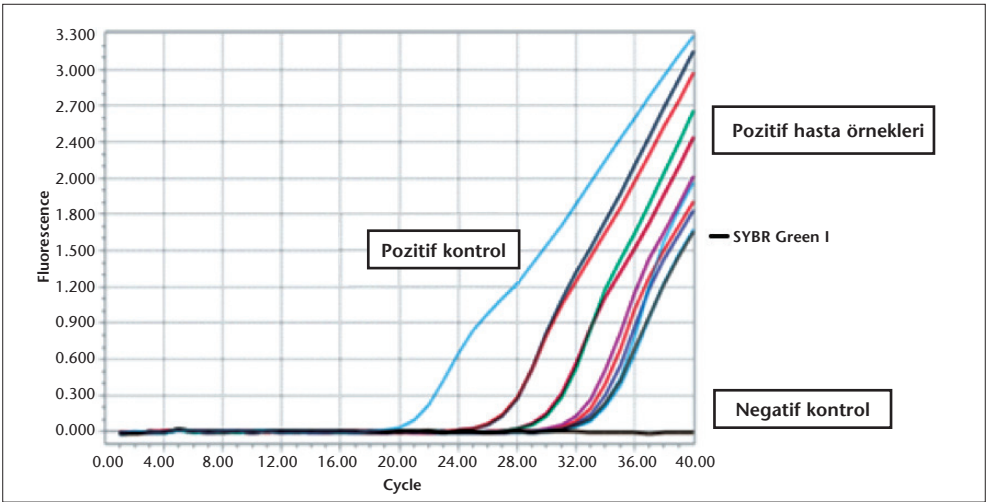
In-house Rt-PCR'nin CT değerleri 20.03-31.71 arasında saptanmıştır (Şekil 2).

Ticari Rt-PCR'nin CT değerleri ise 17.26-34.94 arasında saptanmıştır. In-house Rt-PCR yöntemi ile olguların 180'i, ticari Rt-PCR yöntemi ile olguların 178'i pozitif olarak belirlenmiştir. In-house Rt-PCR ile 2 örnek (Tablo III), ticari Rt-PCR ile 4 örnek yalancı negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo IV).

In-house ve ticari Rt-PCR ile yalancı negatif olarak belirlenen 2 örnek aynı hastaya ait bulunmuştur. Ticari Rt-PCR ile 2 örnek daha negatif olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandığında in-house Rt-PCR yönteminin duyarlılığı 0.98, özgüllüğü 0.97, pozitif prediktif değeri (PPD) %98, negatif prediktif değeri (NPD) %97 olarak, ticari Rt-PCR yönteminin duyarlılığı 0.97, özgüllüğü 0.95, PPD %97, NPD %95 olarak belirlenmiştir. In-house ve Rt-PCR yöntemleri arasında yüksek düzeyde uyum (κ : 0.953) belirlenmiştir (Tablo V).



Şekil 1. In-house Rt-PCR erime eğrileri. M: *P.malariae* pozitif kontrol örneğinin erime eğrisini, F: *P.falciparum* pozitif kontrol örneğinin erime eğrisini, O: *P.ovale* pozitif kontrol örneğinin erime eğrisini, V: *P.vivax* pozitif kontrol örneğinin erime eğrisini göstermektedir.



Şekil 2. In-house Rt-PCR amplifikasyon eğrileri.

Tablo III. In-house Rt-PCR Yönteminin Multipleks Nested PCR Yöntemiyle Karşılaştırmalı Sonuçları

In-house Rt-PCR	Multipleks Nested PCR		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	180	2	182
Negatif	2	96	98
Toplam	182	98	280

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo IV. Ticari Rt-PCR Yönteminin Multipleks Nested PCR Yöntemiyle Karşılaştırmalı Sonuçları

Ticari Rt-PCR	Multipleks Nested PCR			Toplam
	Pozitif	Negatif		
Pozitif	178	4		182
Negatif	4	94		98
Toplam	182	98		280

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo V. In-house Rt-PCR ile Ticari Rt-PCR Yönteminin Karşılaştırmalı Sonuçları

Ticari Rt-PCR	In-house Rt-PCR			Toplam
	Pozitif	Negatif		
Pozitif	178	4		182
Negatif	2	96		98
Toplam	180	100		280

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, Rt-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

TARTIŞMA

Sıtma tanısında referans yöntem kalın damla ve ince yayma preparatların mikroskopik incelemesidir². Moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında mikroskopik inceleme maliyet-etkin olmasına rağmen, değerlendiren kişinin deneyimi sonucu etkileyebilmektedir. Bu yöntem deneyimli personele gereksinim duymaktadır ve çok sayıda örneğin kısa sürede taranması için uygun değildir. Parazitemi düzeyi düşük örneklerde preparat hazırlığı hariç, değerlendirme süresi 45-90 dakikadır⁹. Bu süreyi kısaltmak için mikroskopik incelemenin yanı sıra hızlı tanı testleri de kullanılmaktadır. Hızlı tanı testleri, mikroskopik inceleme ile karşılaştırıldığında kolay uygulanabilir, hızlı sonuç verebilen yöntemlerdir. Ancak hızlı tanı testleri *P.falciparum* ve *P.vivax*'ı ayırt edebilmekte, *P.malariae* ve *P.ovale*'yi ayırt edememektedir². Subklinik veya asemptomatik enfeksiyonlar sıtma endemik bölgelerde yaygın olup tanısı güçtür. Bu olgular, saptama limiti 50-100 parazit/µl olan mikroskopik inceleme ve/veya hızlı tanı testleri ile sıklıkla gözden kaçırılmakta, bu kişiler bulaştırıcı olmaya devam etmekte, sıtmanın eliminasyon çalışmalarına engel olmaktadır¹⁰. Mikroskopik inceleme ve hızlı tanı testlerinin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için günümüzde moleküler yöntemler önem kazanmaktadır.

PCR yöntemi, hızlı tanı testleri ile saptanmasına rağmen tür ayırımı yapılamayan olgularda, *P.falciparum* dışındaki türlerle enfeksiyon veya mikst enfeksiyon durumlarında değerlidir ve tedavi takibinde tercih edilen bir yöntemdir¹¹. Konvansiyonel ve Rt-PCR'nin de kısıtlılıkları ve birbirlerine üstünlükleri vardır. Konvansiyonel PCR yönteminin maliyetinin düşük olması nedeniyle Rt-PCR yerine kullanılabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur¹². Nested PCR, spesifik ve duyarlı bir tanı yöntemi olmakla birlikte, sonuç verme süresinin

uzun olması nedeniyle kullanımı kısıtlıdır¹³. Rt-PCR yöntemiyle örneğin hazırlanma süresi de dahil olmak üzere üç saat içinde sonuç bildirilebilmektedir^{2,12}. Daha kısa sürede verilen hasta sonucu, tanı konulmamış ya da yanlış tanı konulmuş olguların hızlı bir şekilde belirlenebilmesi ve hasta yönetimine olumlu bir etki yapacaktır². Rt-PCR ile, amplifikasyon sonrası DNA kontaminasyon riski düşüktür, parazitin kantitasyonu da yapılabilmektedir^{12,13}. Ancak bu yöntem, düşük parazitemi oranlarında yüksek duyarlılık gösterirken, mikst enfeksiyonların saptanmasında düşük duyarlılığa sahiptir. Mikst enfeksiyon durumlarında, düşük yoğunlukta görülen *Plasmodium* türlerinin DNA'sının saptanmasında primer rekabeti görülmektedir². Parazitin tür ayrımı hastaların klinik yönetimi açısından kritiktir, çünkü tedavinin seyri enfeksiyona neden olan türe bağlı olarak değişmektedir⁸. PCR tekniğinin bir diğer dezavantajı başarısının, uygun olmayan kan örneği alma ve örnek saklama gibi faktörlerden etkilenebilecek DNA kalitesine dayanmasıdır⁹.

Sıtma tanısında kullanılan moleküler yöntemler değerlendirildiğinde farklı primer setleriyle konvansiyonel, in-house ve ticari Rt-PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Bunlar arasında PL1473F18 ve PL1679R18 primerleri kullanılarak *Plasmodium* spp.'nin 18S rRNA geninin türe özgü bölgesini hedefleyen Rt-PCR yöntemi uygulanan çalışmaların yanı sıra^{8,14}, rPLU1, rPLU5 ve/veya rPLU3, rPLU4 (evrensel primerler) ve/veya rPLU5, rPLU6 ve rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 (türe özgü primerler) ile nested PCR yöntemini uygulayan çalışmalar^{2,9,10,13,15-18} ve farklı ticari kitlerin^{13,14} kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda multipleks nested PCR yöntemi için *Plasmodium* cinsine özgü rPLU1, rPLU5 primerleri ve türe özgü rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerleri, in-house Rt-PCR yöntemi için PL1473F18 ve PL1679R18 primerleri, ticari Rt-PCR yöntemi için *Plasmodium* spp. (18S ribozomal RNA geni) ve her bir alt tür için ayrı olmak üzere ticari kit (Genesig, İngiltere) kullanılmıştır. Multipleks nested PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmiştir.

Seçilen primerlerin saptama limiti değerlendirildiğinde, PL1473F18 ve PL1679R18 primerlerinin saptama limitinin 1 parazit/µl kan olarak belirlendiği çalışmalar⁸, rPLU1, rPLU5 ve/veya rPLU3, rPLU4 ile rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerlerinin kullanıldığı nested PCR'nin *P.vivax* için saptama limitinin 1-10 parazit/µl kan, *P.falciparum* için 10-50 parazit/µl kan, *P.malariae* için 50-100 parazit/µl kan, *P.ovale* için 5-10 parazit/µl kan olarak belirlendiği çalışmalar^{9,10,15} ve rPLU5, rPLU6, FAL1, FAL2 primerleri ile nested PCR'nin saptama limitinin 0.05-3.6 parazit/µl kan olarak belirlendiği çalışmalar^{13,16-18} olduğu görülmektedir. Çalışmamızda PL1473F18 ve PL1679R18 primerlerinin kullanıldığı in-house Rt-PCR yönteminin saptama limitinin klonlanmış *P.vivax* pozitif örnek için reaksiyonda 24 kopya (4.8 parazit/µl) olduğu saptanmıştır. PL1473F18 ve PL1679R18 primerleri ile Rt-PCR yönteminin tekli enfeksiyonların yanı sıra mikst enfeksiyonları da saptayabildiği bildirilmektedir⁸. Çeşitli çalışmalarda rPLU1, rPLU5 ve/veya rPLU3, rPLU4 (evrensel primerler) ve rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 (türe özgü primerler) ile nested PCR'nin hem tekli hem de mikst enfeksiyonları belirleyebildiği bildirilmiştir^{2,15}. Çalışmamızda pozitif olarak belirlenen kan örneklerinin tümü *P.vivax* olup, mikst enfeksiyon saptanmamıştır.

Bir testin doğrulama testi olarak kabul edilmesi için özgüllüğünün yüksek olması gereklidir. Seçilen primerler duyarlılık ve özgüllükleri açısından değerlendirildiğinde PL1473F18 ve PL1679R18 primerlerinin kullanıldığı Rt-PCR'nin *P.vivax* için duyarlılığının %100, özgüllüğünün %99.1, *P.falciparum* için duyarlılığının %94.1, özgüllüğünün %100 olarak belirlendiği bir çalışma⁷ ve rPLU1, rPLU5 ve/veya rPLU3, rPLU4 ile rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerlerinin kullanıldığı nested PCR'nin duyarlılığının %100, özgüllüğünün %97.2 olarak belirlendiği bir başka çalışmanın¹⁹ olduğu belirlenmiştir. Nested PCR'nin mikroskopik incelemeye göre duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle altın standart yöntem olarak kabul edildiği bir başka çalışma da bulunmaktadır²⁰. Çalışmamızda nested PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde in-house Rt-PCR yönteminin duyarlılığı %98, özgüllüğü %97, ticari Rt-PCR yönteminin duyarlılığı %97, özgüllüğü %95 olarak belirlenmiştir.

PL1473F18 ve PL1679R18 primerlerinin kullanıldığı Rt-PCR'nin erime eğrisi analiziyle Tm değerleri arasında en az 1°C'lik fark sağlayacak şekilde dört tür arasında ayırım yapmak için yeterli olduğu bildirilmiştir. Tm değerleri *P.vivax* için 79.0-81.0°C, *P.falciparum* için 75.5-77.5°C, *P.malariae* için 73.5-75.5°C, *P.ovale* için 77.5-79.0°C olarak belirlenmiştir⁸. Çalışmamızda aynı primerler kullanıldığında in-house Rt-PCR ile *P.vivax* pozitif örneklerin Tm değerleri 78-79, *P.falciparum* pozitif örneklerin Tm değerleri 75-75.5, *P.malariae* pozitif örneklerin Tm değerleri 74-74.5, *P.ovale* pozitif örneklerin Tm değerleri 76.5-77 olarak saptanmıştır (Şekil 1). Bu yöntem tek bir reaksiyonla parazitin tür ayrımının yapılması için yeterli ve uygun bulunmuştur. İlgili literatürle aynı primerleri kullanmamıza rağmen, elde edilen erime eğrilerindeki farklılıkların DNA alikotlarındaki tuz konsantrasyonlarının farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Rt-PCR yöntemi CT değerleri açısından değerlendirildiğinde genel olarak parazit yoğunluğu ile CT değeri arasında negatif bir ilişki bulunmakta, parazit yoğunluğu arttıkça CT değeri azalmakta ve daha erken pozitiflik gözlenmektedir¹⁷. CT değerlerinin düşük bulunması, uygulanan yöntemin DNA'yı daha iyi saptayabildiğini göstermektedir^{11,14}. Çalışmamızda CT değerinin 35'in üzerinde olduğu örnekler negatif olarak kabul edildi. In-house Rt-PCR ile pozitif örneklerin CT değerleri 20.03-30.95 arasında, ticari Rt-PCR ile pozitif örneklerin CT değerleri ise 17.26-34.94 arasında saptandı. İki yöntemin CT değerleri karşılaştırıldığında ticari Rt-PCR ile parazitemi oranı yüksek örneklerin CT değerinin in-house Rt-PCR'den daha düşük olduğu, ancak parazitemi oranı düşük örneklerin CT değerinin in-house PCR'den daha yüksek olduğu belirlendi. Ticari Rt-PCR yöntemi ile dört örneğin yalancı negatif olarak belirlenmesinin nedeninin yüksek CT değerlerinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kappa değeri (κ), iki gözlemci arasındaki uyumun şansa bağlı kısmını düzelten bir uyum ölçüsüdür. Karşılaştırılan iki test arasındaki uyumun yüksek bulunması durumunda, yapılan değerlendirmeler güvenilir olarak kabul edilmektedir²¹. Uygulanan yöntemlerin birbiriyle uyumu değerlendirildiğinde rPLU1, rPLU5 ve/veya rPLU3, rPLU4 ile rVIV1, rVIV2, rFAL1, rFAL2, rMAL1, rMAL2, rOVA1, rOVA2 primerlerinin kullanıldığı iki nested

PCR ve Rt-PCR yöntemleri arasında mükemmel uyum belirlenen çalışmalar olduğu belirlenmiştir^{2,10,15}. Çalışmamızın sonucunda PL1473F18 ve PL1679R18 primerlerinin kullanıldığı in-house Rt-PCR ile ticari Rt-PCR yöntemi arasında yüksek düzeyde uyum (κ : 0.953) saptanmıştır.

Multipleks nested PCR yöntemi aynı anda birçok türü tespit edebilmektedir. Ancak bu yöntem iki ardışık PCR amplifikasyonu gerektirdiğinden kısa sürede çok sayıda örneğin taranması için uygun değildir. Sonucun değerlendirilebilmesi için jel elektroforeze ihtiyaç duyulması gibi nedenlerle hem maliyeti yükselmekte hem de sonuç verme süresi uzamaktadır. Ayrıca, kontaminasyon riski de Rt-PCR'ye göre daha yüksektir. Kısa sürede çok sayıda örneğin taranması için daha hızlı ve daha düşük maliyetli bir moleküler yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Tek aşamalı ve erime eğrisi analizi ile tür ayırımına olanak veren in-house Rt-PCR yöntemi daha az reaktif ve sarf malzemesi kullanımına ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca kapalı bir sistem olması nedeniyle kontaminasyon riski de konvansiyonel PCR'ye göre oldukça düşüktür. Ticari Rt-PCR yöntemi ile sıtma şüpheli kan örneklerine öncelikle *Plasmodium* spp.'yi saptamaya yönelik primerler kullanılarak PCR, ardından pozitif çıkan örnekler tür ayırımı amacıyla her bir alt türü içeren primerler kullanılarak ikinci bir PCR yöntemi uygulanması gerekmektedir. Bu şekilde *Plasmodium* spp. pozitif olan her bir örnek için altı farklı PCR uygulanmakta, hem maliyet hem de tanı koyma süresi artmaktadır. Ayrıca bu yöntemin yalancı negatiflik oranı gözönüne alındığında negatif sonuç alınan örnekler doğrulama amacıyla nested PCR uygulanmasının da gerekli olduğu düşünülmektedir.

Sıtma şüphesi ile laboratuvarımıza gelen kan örneklerine uygulanan tanı algoritması, öncelikle mikroskopik inceleme ve hızlı tanı testleri uygulandıktan sonra tür ayırımı ve doğrulama amacıyla moleküler yöntemlerin uygulanması şeklindedir. Maliyet, tanı koyma süresi ve duyarlılık, özgüllük oranları birlikte değerlendirildiğinde in-house Rt-PCR yönteminin rutin hasta tanısında birinci tercih olarak düşünülebileceğine karar verilmiştir. Ayrıca negatif sonuç alınan örnekler, doğrulama amacıyla nested PCR uygulanmasının daha güvenilir sonuçlar için gerekli olduğu düşünülmüştür.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Alver O, Ener B. Bursa'da 2013-2014 yılları arasında sıtma epidemiyolojisi. Turk Hij Den Biyol Derg 2018; 75(1): 37-42.
2. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. A multiplexed real-time PCR assay for malaria speciation with improved sensitivity for mixed infections. J Clin Microbiol 2009; 47(4): 975-80.
3. Zorbozan O, Pullukçu H, Atalay Şahar E, Karakavuk M, Can H, Tunali V, et al. Mikroskopide atipik görünümü dış kaynaklı iki sıtma olgusunda hızlı test, serolojik ve moleküler yöntemlerin tanıya katkısının önemi. Mikrobiyol Bul 2017; 51(4): 396-403.
4. Özbilgin A, Topluoğlu S, Es S, İlek E, Mollahaliloglu S, Erkoç Y. Malaria in Turkey: successful control and strategies for achieving elimination. Acta Trop 2011; 120: 15-23.

5. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>
6. Farcas GA, Soeller R, Zhong K, Zahirieh A, Kain KC. Real-time polymerase chain reaction assay for the rapid detection and characterization of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. *Clin Infect Dis* 2006; 42(5): 622-7.
7. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studie. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(4): 687-92.
8. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner MA, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2435-40.
9. Stanis CS, Song BK, Chua TH, Lau YL, Jelip J. Evaluation of new multiplex PCR primers for the identification of *Plasmodium* species found in Sabah, Malaysia. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 207-18.
10. Lau YL, Lai MY, Anthony CN, Chang PY, Palaeya V, Fong MY, et al. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of five human *Plasmodium* species. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92(1): 28-33.
11. Cnops L, Jacobs J, Van Esbroeck M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(7): 1101-7.
12. Gama BE, Silva-Pres FES, Lopes MNKR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol* 2007; 116(4): 427-32.
13. Kim JY, Goo YK, Ji SY, Shin HI, HanET, Hong Y, et al. Development and efficacy of real-time PCR in the diagnosis of vivax malaria using field samples in the Republic of Korea. *PLoS One* 2014; 9(8): e105871.
14. Hagen RM, Hinz R, Tannich E, Frickman H. Comparison of two real-time PCR assays for the detection of malaria parasites from hemolytic blood samples-short communication. *European J Microbiol Immunol* 2015; 5(2): 159-63.
15. Wang B, Han SS, Cho C, Han JH, Cheng Y, Lee SK, et al. Comparison of microscopy, nested-PCR, and real-time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in Myanmar. *J Clin Microbiol* 2014; 52(6): 1838-45.
16. Ávila JG. Sensitivity of malaria diagnosis in blood samples by PCR assay: A comparison with microscopy. United States Army Center for Health Promotion and Prevention - West, Fort Lewis Division, 2005 (Erişim Adresi: <https://pdfs.semanticscholar.org/73b2/0c93963b4847a5e4d0a4947d7fc88ee9b523.pdf>).
17. Tran TM, Aghili A, Li S, Ongoiba A, Kayentao K, Doumbo S, et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted form dried blood spots. *Malar J* 2014; 13: 393.
18. Lima GFMC, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AAC, Hristov AD, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(6): 691-700.
19. Yentur Doni N, Yıldız Zeyrek F, Seyrek A. Detection of *Plasmodium* using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey. *Malar J* 2016; 15: 299.
20. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1214-9.
21. Gözükarı Bağ HG, Karabulut E, Alpar CR. 2X2 gözlü tablolarda gözlemciler/gözlemler arası uyumun değerlendirilmesi. *Hacettepe Dış Hek Fak Derg* 2010; 34(1-2): 46-52.