

# İntestinal Helmintlere Ait İkili ve Tekli PZR Protokollerinin Geliştirilmesi: Multipleks PZR Yolunda Bir Ön Çalışma

## Development of Dual and Single PCR Protocols for Intestinal Helminths: A Preliminary Study on Multiplex PCR

Hayriye Kırkoyun Uysal<sup>\*✉</sup>, Sinem Öktem Okullu<sup>\*\*✉</sup>, Elif Merve Aydın<sup>\*\*\*✉</sup>, Eray Şahin<sup>\*\*\*\*✉</sup>, Bahar Akgün Karapınar<sup>\*✉</sup>, Özgür Kurt<sup>\*\*✉</sup>

\* İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

\*\* Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

\*\*\* Koç Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hücresel ve Moleküler Tıp Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

\*\*\*\* Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik ve Biyoinformatik Programı, İstanbul, Türkiye

**Atf/Cite as:** Kırkoyun Uysal H, Öktem Okullu S, Aydın EM, Şahin E, Akgün Karapınar B, Kurt Ö. İntestinal helmintlere ait ikili ve tekli PZR protokollerinin geliştirilmesi: Multipleks PZR yolunda bir ön çalışma. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2022;52(1):73-81.

### ÖZ

**Amaç:** Bir proje kapsamında yapılan bu ön çalışmada, dünyada ve ülkemizde ölümcül ve kronik klinik olgulara yol açtığı bilinmesine rağmen, tanı seçenekleri sınırlı olan bazı intestinal helmintlerin çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle saptanabilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Ortak çalışmalar için yurt dışındaki bir merkezden temin edilen *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.* ve *Strongyloides stercoralis* DNA'ları kullanılarak, proje süresi kapsamında, önce tekli, sonra ikili optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma kapsamında, *T. trichiura*'nın tekli (280 bp), *A. lumbricoides* (995 bp) - *S. stercoralis* (115 bp) ile *Taenia spp.* (950 bp) - *E. vermicularis* (400 bp)'in ikili optimizasyonları tamamlanmış, söz konusu helmintlere ait tanı protokolleri tanımlanmıştır.

**Sonuç:** Tamamlanan ön çalışmada araştırılan helmintlere ait iki ayrı çoklu PZR protokolü tanımlanmıştır. Sonraki dönemde, ikili PZR protokolünün genişletilerek daha çok helminti bir defada saptayabilir hâle getirilmesi yanında yeni çalışmalarla geliştirilen çoklu PZR protokollerinin hasta ve sağlıklı bireylerin dışkılarındaki tanısız duyarlılık ve özgünlüklerinin araştırılması hedeflenmektedir. Bu çabaların intestinal helmintlerin epidemiyolojisi ve klinik tablolardaki rollerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunması beklenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Türkiye, İntestinal helmint, çoklu polimeraz zincir reaksiyonu, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.*, *Strongyloides stercoralis*

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this initial study of a project is to identify some intestinal helminths which have limited diagnostic options despite their known associations with fatal and chronic clinical cases in the world and in our country, using multiplex PCR.

**Method:** Using the DNAs of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.* and *Strongyloides stercoralis* which have been received from a foreign center for joint studies, single and double optimization trials of the helminths were made within the project.

**Results:** In the end of the study period, single optimization of *T. trichiura* (280 bp) as well as double optimizations of *A. lumbricoides* (995 bp) - *S. stercoralis* (115 bp) and *Taenia spp.* (950 bp) - *E. vermicularis* (400 bp) were completed successfully, and their diagnostic protocols were described.

**Conclusion:** Two different duplex, and a single PCR protocol have been completed in the initial study. The aim in the next term will be both to increase the number of helminths within the PCR protocol, and determination of the sensitivity and specificity of the tests using the stool samples of healthy persons and patients in new studies. These efforts will hopefully contribute to better understanding the epidemiology and roles of intestinal helminths in clinical cases.

**Keywords:** Turkey, Intestinal helminth, Multiplex PCR, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia spp.*, *Strongyloides stercoralis*

### Alındığı tarih / Received:

11.01.2022 / 11.January.2022

### Kabul tarihi / Accepted:

11.02.2022 / 11.February.2022

### Erken çevrimiçi / First Published:

31.03.2022 / 31.March.2022

### ORCID Kayıtları

H. Kırkoyun Uysal 0000-0002-2476-3796

S. Öktem Okullu 0000-0002-2255-0930

E. M. Aydın 0000-0003-4548-5227

E. Şahin 0000-0002-0873-2439

B. Akgün Karapınar 0000-0002-3470-5346

Ö. Kurt 0000-0001-5575-588X

✉ hayriye.kirkoyun@istanbul.edu.tr

## GİRİŞ

Bağırsak parazitleri, özellikle gelişmekte olan ülkelerin en önemli toplum sağlığı sorunları arasında yer almaktadır. Bu ülkelerde sınırlı parasal olanaklara bağlı temiz içme suyu ve etkin kanalizasyon sistemlerinin yokluğu, bireysel ve toplumsal hijyenin yetersizliği ve benzeri nedenlerle bağırsak parazitleri yalnızca kırsal bölgelerde değil şehirlerde de yaygın görülebilmektedir<sup>(1-6)</sup>. Türkiye’de bağırsak parazitlerinin yol açtığı enfeksiyonların görülme sıklığı, farklı yöntemlerle yapılan farklı çalışmalarda %2.2-52.7 aralığında bildirilmiştir, ancak gerçek oranın özellikle sosyoekonomik olarak sınırlı bölgelerde çok daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir<sup>(2-5)</sup>. Erişkinlerde ciddi klinik bozukluklara yol açıp bazen yaşamı tehdit edebilen bağırsak parazitleri, etkin tedavi alıp iyileşemeyen çocuklar içinse kronikleşip büyüme-gelişme geriliğine yol açabilmektedir<sup>(1,2)</sup>. Bağırsak parazitleri içinde helmintler, çoğunlukla kırsal bölgelerde yaşam döngülerini kolayca tamamlayarak da şehirlerde yaşayan insanlarda da görülebilmektedir, ancak mikroskopik tespiti dayalı laboratuvar tanısında, hastanın çoğunlukla yalnızca bir güne ait dışkı örneği incelenebildiğinden, protozoonlar gibi helmintler de gözden kaçabilmektedir<sup>(1,2,6-8)</sup>. Bu durum hastaların belirlenip tedavi edilmelerinin yanı sıra helmint enfeksiyonlarının toplumsal kontrolünde yetersizliğe yol açmaktadır.

Klinik açıdan önemli helmintler arasında *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, kancalı kurt enfeksiyonları (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*) ve *Taenia saginata* sayılabilir<sup>(1,2)</sup>. Bunlar arasında *E. vermicularis* ölümcül olmayan, ancak saptandığında aynı evde yaşayan herkesin tedavi olmasını gerektiren yaygın bir helminttir<sup>(2)</sup>. *E. vermicularis* enfeksiyonunun başlıca belirtisi anal kaşıntıdır; ağır olgularda ender olarak epilepsi nöbetleri yanında kız çocuklarında idrar yolu enfeksiyonları ve apandisit gibi ciddi bozukluklara yol açabilmektedir<sup>(1,2,9)</sup>. Dışkı incelemesinde *E. vermicularis* yumurtalarına rastlanabilmekle birlikte, tüm dünyada esas olarak anal bant yöntemi ile tanı konulmaktadır<sup>(1,2,8)</sup>. Bu yöntemin uygulanmasıyla ilgili özel şartlar gerekmesi (sabah uyanır uyanmaz örnek alınması veya kesin

sonuç için üç ayrı gün örnek alınması gereği), parazitin tanıda çoğunlukla atlanmasına neden olmaktadır<sup>(7-9)</sup>.

*Ascaris lumbricoides*, dünyada en sık görülen bağırsak parazitlerinden olup, her yıl yaklaşık 60 bin kişinin ölümüne yol açtığı bildirilmektedir<sup>(10)</sup>. Olgular tropikal ve subtropikal bölgelerde yoğunlaşmakta ve ağırlıklı olarak Sahra altı Afrika, Güney Amerika, Çin ve Uzak Asya’dan bildirilmektedir. Ülkemizde de ascariasis olgularına rastlanılmaktadır<sup>(11)</sup>. *A. lumbricoides*’in erişkinleri bağırsaklarda, larva formları ise karaciğer ve akciğerlerde yaşamaktadır<sup>(1,2,10)</sup>. *A. lumbricoides* enfeksiyonu, parazitlerin larva formundan erişkin olana kadar yaptıkları vücut içi yolculuk nedeniyle çeşitlilik göstermekte, Löffler pnömonisinden ölümcül ileusa kadar değişebilmektedir. Tanıda dışkının mikroskopik incelenmesinin yanı sıra radyolojik incelemelerin de katkısı bulunmaktadır; son yıllarda birçok bağırsak paraziti gibi *A. lumbricoides* için de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR; polymerase chain reaction – PCR) yöntemi bulunmaktadır<sup>(2,11-15)</sup>.

Yaygın ve klinik açıdan önemli bir diğer helmint olan *T. trichiura*, *A. lumbricoides* gibi, yumurtalarının insanlara ağız yoluyla bulaşması sonrası larvalarının çekum mukozasına yerleşmesiyle karakterizedir<sup>(12,16)</sup>. Ağır enfeksiyonlarda, hastalarda dizanteriye yol açabildikleri gibi rektum dokusunun anüsten dışarı çıktığı, “rektal prolapsus” adı verilen bozukluğa da yol açabilirler<sup>(1,2,16,17)</sup>. Tanıda mikroskopik incelemede limon şeklindeki tipik yumurtaların görülmesi olasıdır, ancak her gün dışkı örneklerinde yumurta bulunamayabileceğinden tanı konulmasında güçlükler yaşanabilmektedir<sup>(8,17-19)</sup>.

*Taenia saginata*, sestoed grubu helmintlerden olup özgün vücut yapısıyla dikkat çekmekte, ince bağırsaklarda yerleşmektedir. Erişkinlerde gövde bölümünde yer alan gebe halkaların ayrılması sonrası dış ortama saçılan *T. saginata* yumurtaları, sığırlar tarafından alındıklarında larvaları (*Cysticercus bovis*) sığırın vücudunda farklı kaslara yerleşebilmektedir<sup>(1,2,20)</sup>. Az pişmiş etlerde canlı kalan bu larvalar ağız yoluyla alınabilmekte, insanların bağırsaklarına yerleşip olgunlaşabilmektedirler. Çoğu olguda uzun süre semptom görülmemekte, ender olarak bulantı, gastrointestinal sistem yakınmaları ve

kilo kaybı görülebilmektedir. Tanı öncelikle hastaların fark edip laboratuvara getirdikleri kopan gebe halkaların makroskobik ve mikroskobik incelemesiyle konulmaktadır. Bunun yanında dışkıda yumurtaların mikroskobik incelemeyle saptanması da olasıdır. *Taenia* spp. konusundaki araştırmalarda kullanılmakta olan PZR protokolleri de mevcuttur<sup>(8,20,21)</sup>.

Özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde tehlikeli bir parazitoz olan strongyloidosis, *S. stercoralis*'in neden olduğu bir enfeksiyondur. Otoenfeksiyon yapabilmesi, özellikle immün sistemi zayıf bireylerde ölümcül olabilen hiperenfeksiyonların oluşmasına yol açar<sup>(1,2,22,23)</sup>. Tanıda dışkı örneğinin mikroskobik incelemesinde larvaların görülmesi, çeşitli konsantrasyon yöntemleriyle larvaların saptanması ve kültür yanında serolojik yöntemler de kullanılmaktadır<sup>(2,8,21-24)</sup>.

Bağırsak helmintlerinin tanısında, etkenleri hızlı, güvenilir ve duyarlı olarak saptayabilecek laboratuvar testlerine gereksinim bulunmaktadır<sup>(13-15)</sup>. Bu kapsamda, moleküler yöntemlerin kullanımı, daha çok protozoonlara bağlı enfeksiyonlarda, tüm dünyada her geçen gün daha da önem kazanan ve yaygınlaşan bir uygulamadır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı olan PZR, yüksek özgüllük ve duyarlılık özellikleri nedeniyle nicel (kantitatif) sonuç verebildiğinde tanıda altın standart olarak tanımlanabilmektedir. Çoklu PZR (Multiplex PCR) yöntemi, tek bir karışımında farklı DNA dizilerine özgü birden fazla primer çifti kullanarak aynı anda birden fazla gen bölgesini çoğaltmayı amaçlayan modifiye edilmiş bir PZR yöntemidir<sup>(13,15)</sup>. Çoklu PZR ile, örneğin hastadaki ishale neden olabilecek birçok patojen tek bir testle araştırılıp saptanabilmektedir. Bu testle ilgili en önemli zorluk, test içindeki tüm mikroorganizmaların etkin düzeyde çoğaltılabileceği uygun sıcaklık ve test sürelerinin ön çalışmalarla belirlenmesidir. Son zamanlarda çoklu PZR ile intestinal helmintlerin saptanmasına yönelik çalışmaların sayısında artış görülmektedir<sup>(15,16,22,23-27)</sup>.

Bu ön çalışmada, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp. ve *S. stercoralis* izolatları kullanılarak özgün bir çoklu PZR yönteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu ön çalışma için, Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda saklanmakta olan, önceki bir ortak çalışma için yurt dışından anonim olarak gönderilmiş *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp. ve *S. stercoralis* DNA'ları kullanılmıştır. Söz konusu DNA örneklerinin ilk aşama için ikili gruplar hâlinde optimize edilmeleri planlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön inceleme sonrası, ikili optimizasyonlarının sıcaklık aralıkları daha yakın olduğundan "*E. vermicularis*-*Taenia* spp." ve "*Ascaris* spp.-*S. stercoralis*." ikilileri oluşturulurken *T. trichiura*'nın tek başına optimize edilmesi planlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 1'de belirtilmiştir.

### *Taenia* spp. ve *Enterobius vermicularis* için ikili PZR optimizasyonu

*Enterobius vermicularis* PZR'si için daha önce kullanılmış bir primer çifti kullanılırken<sup>(28)</sup>, *Taenia* spp. için bu çalışmada, GenBank üzerinden yeni bir primer çifti tasarlanmıştır. Söz konusu primer dizileri ve hedeflenen yaklaşık PZR ürün uzunlukları Tablo 1'de sunulmuştur. Bu iki hedefin aynı PZR'de belirlenebilmesi amacıyla ilgili pozitif kontrol DNA'larının kullanıldığı ve farklı sıcaklık derecelerinin denendiği "Gradient PZR" çalışması yapılmıştır. GeneMark 5X PCR Dye Master Mix II (Cat. No: RP02D-II-A) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan, iki hedefin pozitif kontrol DNA'larının kullanıldığı karışım içeriği Tablo 2'de, ısı döngü cihazı PZR programı ise Tablo 3'te belirtilmiştir.

Laboratuvarda yaptığımız denemeler sonrası PZR ürünleri %2'lik agoroz jelde, 120 V'da 40 dk. yürütülmüş; jel Etidyum Bromür çözeltisinde 30 dk. bekletildikten sonra Chemidoc Görüntüleme Cihazı (ChemiDoc™ XRS+ System, Bio-Rad Laboratories Inc., ABD) kullanılarak UV ışığı altında görüntülenmiştir. Bu işlem standart olarak diğer helmintler için de uygulanmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Dizi	PZR Ürünü Boyu (bç)	Tm değeri (°C)
<i>Taenia spp.</i> - F*	5'-GTCAGTATGAATAACTCGTGACGTA-3'	950	63.0
<i>Taenia spp.</i> - R**	5'-TCTGCTATGCCACTGGGAC-3'		
<i>Trichuris trichiura</i> - F	5'-GGCCCTGCTACTTTTCACCT-3'	280	55.0
<i>Trichuris trichiura</i> - R	5'-CTGGCTGGACGAAGCGTTTA-3'		
<i>Enterobius vermicularis</i> – F	5'-CACTTGCTATAACCAACAC-3'	400	63.0
<i>Enterobius vermicularis</i> – R	5'-GCGCTACTAAACCATAGACG-3'		
<i>Ascaris lumbricoides</i> – <i>Ascaris</i> -F	CTACCACATCCAAGGAAGGC	995	59.4
<i>Ascaris lumbricoides</i> – <i>Ascaris</i> -R	CTGAATACCGCTTGTCCTC		
<i>Strongyloides</i> -F	ATCGTGTCGGTGGATCATT	115	55.9
<i>Strongyloides</i> -R	CTATTAGCGCCATTGTCATTC		

\*F: Forward; ileri yönlü primer

\*\*R: Reverse; geri yönlü primer

Tablo 2. *Taenia spp.* ve *Enterobius vermicularis* çoklu gradient PZR karışım içeriği

Kimyasal (Stok Konsantrasyonu)	Miktar (1 reaksiyon için)
GeneMark PZR Karışımı (5X)	5 µL
<i>Taenia spp</i> – F (10 mM)	0.5 µL
<i>Taenia spp</i> – R (10 mM)	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – F (10 mM)	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – R (10 mM)	0.5 µL
<i>Taenia spp</i> – Kalıp DNA	0.5 µL
<i>E. vermicularis</i> – Kalıp DNA	0.5 µL
Nükleaz içermeyen Su	17 µL

Tablo 3. *Taenia spp* ve *Enterobius vermicularis* multipleks gradient PZR programı

Derece	Süre
94 °C	3 dk.
94 °C	30 sn.
Gradient (59 - 63 °C aralığı)	35 tekrar
72 °C	1 dk.
72 °C	10 dk.
4 °C	Sonsuz

### *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis* için ikili PZR Protokolünün Oluşturulması:

*Ascaris spp.* ve *Strongyloides spp.* DNA dizilerini tek bir karışımında amplifiye edebilmek için Tablo 4'te belirtilen çoklu PZR karışımı hazırlanmış ve pozitif kalıp DNA olarak *Ascaris spp.* ve *Strongyloides spp.* genomik DNA izolatları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise DNA içermeyen PZR karışımı kullanılmıştır. Optimum yapışma (annealing) sıcaklık değeri için gradient PZR yapılmış ve en uygun sıcaklık 62°C olarak belirlenmiştir. Çoklu PZR çalışması için T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, ABD) cihazı kullanılmış ve Tablo 5'te belirtilen PZR koşulları takip edilmiştir.

### *Trichuris trichiura* için PZR optimizasyonu

*Trichuris trichiura*'nın PZR ile belirlenmesi için de GenBank üzerinden yeni bir primer çifti tasarlanmıştır (Tablo 1). Tasarlanan primerlerin ideal çalışma sıcaklıkları ve özgün hedef bölgenin çoğaltılmasına yönelik optimizasyonu için gradient PZR yapılmış, bu amaçla hazırlanan karışımının içerik bilgisi Tablo 6'da, PZR programının detayları ise Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 4. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'in ikili PZR karışım içeriği

PZR Karışımı	Miktar
PFU Master Mix (5X)	5 µL
Forward Primer (10mM)	0.3 µL + 0.3 µL
Reverse Primer (10mM)	0.3 µL + 0.3 µL
dH <sub>2</sub> O	17.8 µL
DNA	0.5 µL + 0.5 µL

Tablo 5. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'in ikili PZR optimizasyon sonuçları

Sıcaklık	Zaman
94°C	3 dk.
94°C	30 sn.
62°C	30 sn. (30X)
72°C	1 dk.
72°C	10 dk.
4°C	Sonsuz

Tablo 6. *Trichuris trichiura* için hazırlanan gradient PZR karışım içeriği

Kimyasal (Stok Konsantrasyonu)	Miktar (1 reaksiyon için)
GeneMark PZR Karışımı (5X)	5 µL
<i>T. trichiura</i> - F (10 mM)	0.5 µL
<i>T. trichiura</i> - R (10 mM)	0.5 µL
<i>T. trichiura</i> - Kalıp DNA	0.5 µL
Nükleazsız Su	18.5 µL

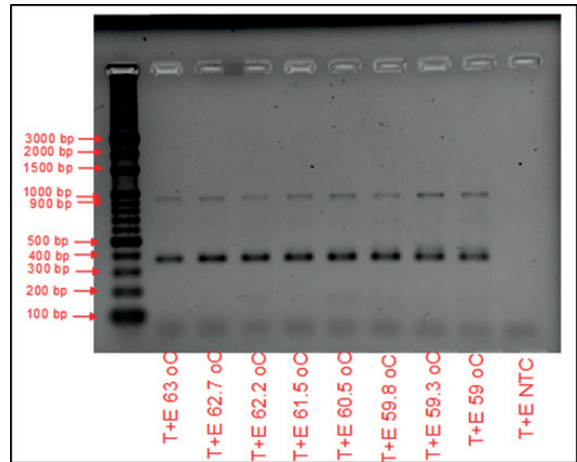
Tablo 7. *Trichuris trichiura* için sürdürülen gradient PZR programı

Sıcaklık	Süre
94 °C	3 dk.
94 °C	30 sn.
Gradient (55 °C ve 60 °C aralığı)	35 tekrar
72 °C	1 dk.
72 °C	10 dk.
4 °C	Sonsuz

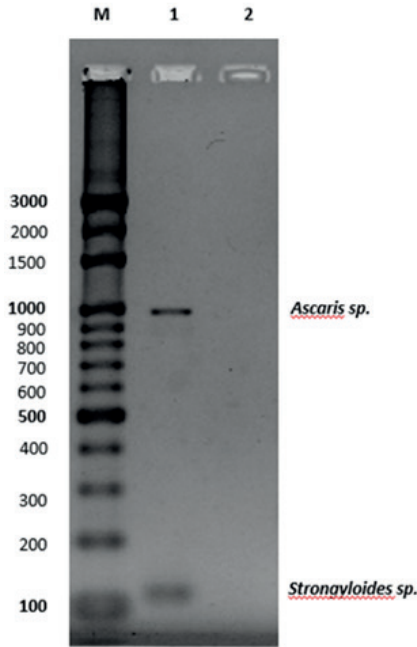
## BULGULAR

Bu ön çalışma kapsamında, söz konusu helmintlerin (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *T. trichiura*, *Taenia* spp. ve *E. vermicularis*) özgün tekli ve ikili (*Taenia* spp. - *E. vermicularis* ve *A.lumbricoides* – *S.stercoralis*) PZR protokolleri geliştirilmiştir.

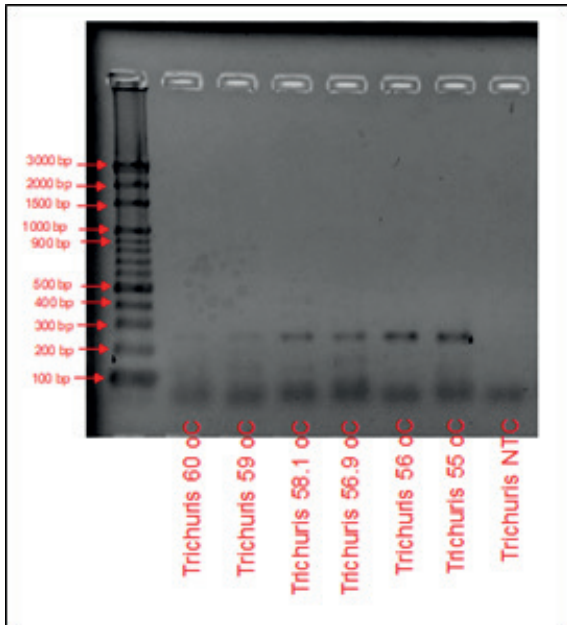
Primerler ile çoğaltılması amaçlanan hedef DNA dizilerine ait uzunluk *Taenia* spp. için yaklaşık 950 bç, *E. vermicularis* için ise yaklaşık 400 bç'dir. Bu doğrultuda denenen sekiz sıcaklıkta da hem *Taenia* spp. hem de *E. vermicularis* için hedef diziler tek reaksiyonda başarıyla çoğaltılabildiği görülmüştür. Bazı sıcaklıklarda görülen spesifik olmayan bantların 62.7°C ve 63°C'lik tutunma sıcaklıklarında ortadan kaybolduğu izlenmiştir (Resim 1).

Resim 1. *Taenia* spp. ve *Enterobius vermicularis* gradient PZR'sine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (T: *Taenia* spp., E: *E. vermicularis*)

Bu bulgular doğrultusunda, *Taenia* spp. ve *E. vermicularis* parazitleri için tasarlanan primerlerin hedef dizileri pozitif kontrol DNA'ları kullanıldığında başarıyla çoğaltabildikleri ve hatta beraber tek reaksiyonda 63°C'lik tutunma sıcaklığında kullanılabilecekleri gösterilmiştir.



Resim 2. *Ascaris lumbricoides* ve *Strongyloides stercoralis*'e ait PZR çalışması, jel elektroforez görüntüsü; Sütun M, 100 bp-3000 bp marker (GeneMark); Sütun 1, *Ascaris* spp. (995 bp) ve *Strongyloides* sp. (115 bp) primerlerinin multiplex PZR reaksiyonu; Sütun 2, negatif kontrol.



Resim 3. *Trichuris trichiura* gradient PZR'sine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çalışmanın bir diğer aşamasında, *Ascaris* spp. ve *Strongyloides* spp. primerlerinin ikili PZR ürünleri jel elektroforez sonucuna göre beklenen bant boyutlarında pozitif sonuç vermiş, protokol başarıyla optimize edilmiştir (Resim 2).

*Trichuris trichiura* için tasarlanan primer çifti ile çoğaltılması amaçlanan hedef DNA dizilerine ait uzunluk için yaklaşık 280 bç'dir. Gerçekleştirilen gradient PZR sonucunda yukarıdaki şekilde de görüleceği üzere; 55°C ve 56°C tutunma sıcaklıkları primerlerin spesifik olarak hedeflenen diziyi çoğaltabildiği değerlerdir ve spesifik olmayan bant gözlenmemiştir (Resim 3).

## TARTIŞMA

İntestinal parazitler olarak genelde akla ilk önce *Entamoeba* spp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. gibi protozoonlar gelse de, helmintlerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri de yüzyıllardır bilinmektedir<sup>(1,2,10)</sup>. Helmint enfeksiyonları sosyoekonomik düzeyi düşük bölgelerde, içme suyu kaynakları ve genel fiziksel altyapının yetersizliğine bağlı hijyen eksikliğiyle doğrudan ilişkili olarak sık görülmektedir<sup>(29)</sup>. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, insanlarda çok sayıda helmint enfeksiyonuna rastlandığı, özellikle çocuklarda rastlanılan helmint enfeksiyonlarının çocuklarda büyüme gelişme geriliği ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>(1,6,30)</sup>.

Tüm dünyada, intestinal parazitlerin tanısında sıklıkla dışkı mikroskopik incelemesi tercih edilmektedir. İntestinal parazitlerin her gün dışkı ile atılmadıkları, dolayısıyla bu incelemelerin bazen "yanlış-negatif" sonuçlanacağı bilinse de, çoğu zaman hastaya ait tek bir dışkı örneği ile tanı konulmaya çalışılmakta, bu nedenle de birçok hastaya tanı konulmadığı tahmin edilmektedir<sup>(1,2,8)</sup>.

Mikrobiyolojik tanıda devrim yaratmış olan PZR, bağırsak parazitlerinden protozoonların rutin tanısında her geçen gün daha sık kullanılmaktadır. PZR'nin geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla çok daha duyarlı ve özgül olduğu, tek bir dışkı incelemesiyle dahi hastadaki parazitin saptanabildiği

gösterildiği gibi<sup>(13-15)</sup>, çalışan personelin maliyetleri ile kıyaslandığında çok sayıda örneğe PZR ile tanı konulmasının rutin tanı maliyetlerini düşürdüğü de bildirilmektedir<sup>(25-27)</sup>. Bu nedenle, PZR'nin intestinal parazitler için altın standart olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir<sup>(31)</sup>. Literatür incelendiğinde, helmintlerle ilgili çoklu PZR çalışmalarında intestinal helmintlere ait çalışmaların daha az yer tuttuğu ancak son yıllarda artış eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir<sup>(23-27)</sup>. Bunun nedenleri arasında, PZR'nin maliyetinin her geçen gün azalmasıyla diğer tanı seçeneklerinin maliyetine yaklaşması sayılabilir<sup>(32)</sup>. Nitekim, Sri Lanka'da yapılan bir çoklu PZR çalışmasında, *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* ve *S. stercoralis*'in bu yöntemle hasta örneklerinde başarıyla denendiği ve maliyetinin mikroskopik incelemeye göre makul düzeyde bulunduğu bildirilmiştir<sup>(23)</sup>. Ayrıca, tanısal etkinlik olarak konsantrasyon yöntemi gibi yaygın kullanılan etkin yöntemlere göre daha etkili protokoller geliştirilmeye başlanmıştır. Son zamanlarda *A. lumbricoides*, *N. americanus* ve *S. stercoralis*'e yönelik geliştirilen çoklu PZR protokolünün, formol eter asetat konsantrasyonuna göre toplamda beş kat, *S. stercoralis* saptamak açısından iki kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir<sup>(32)</sup>. Ülkemizde de yer yer klinik olgular<sup>(33,34)</sup> bildirilen *S. stercoralis* enfeksiyonu ile ilgili özgün bir PZR protokolü geliştirilmesi, özellikle immünsüpresif hastalara yönelik taramalarda kullanılıp hasta için etkin bir tanı ve tedavi hizmeti verilmesine olanak sağlayabilir.

Proje kapsamında yapılan bu ön çalışmamızda, klinik açıdan önemli enfeksiyonlara yol açtığı bilinen ancak tanısal seçenekleri sınırlı intestinal helmintlerin moleküler tanısı kapsamında ikili ve tekli PZR ile tanısına yönelik optimizasyon deneyleri tamamlanmıştır. Deneyler kapsamında *Taenia* spp. - *E. vermicularis* ile birlikte *A. lumbricoides* - *S. stercoralis* için kullanılabilir ikili PZR protokolleri geliştirilmiştir. Bu iki protokolden özellikle *A. lumbricoides* ve *S. stercoralis*'in birlikte saptanabildiği protokol, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda *S. stercoralis*'in neden olduğu klinik durumlar düşünüldüğünde yaşam kurtarıcı olabilir<sup>(22,33,34)</sup>. *A. lumbricoides* enfeksiyonunda vücuttaki parazitlerin erkek cinse ait olması durumunda mikroskopik tanıda yumurta görülemeyip tanı konulamaması olasıdır;

bunun yanında parazitin ileus gibi yaşamı tehdit eden klinik tablolara yol açabildiği düşünüldüğünde çoklu PZR ile *A. lumbricoides* aranması yaşam kurtarıcı dahi olabilecektir<sup>(2,10,26)</sup>.

Geliştirdiğimiz diğer protokol ile, yine tanısında zorluklar yaşanan iki helmintin, *E. vermicularis* ile *Taenia* sp., bir arada etkin saptanması mümkün olabilecektir. Halk arasında kıl kurdu olarak bilinen *E. vermicularis*, özellikle çocuklarda çok yaygın görülmekle birlikte, rutin dışkı incelemesinde ender olarak tanı konulabilmekte, parazit çoğunlukla anal bant yöntemiyle saptanabilmektedir<sup>(2,9)</sup>. Bu yöntemin doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi (tuvalet öncesi, banyo veya duş ile temizlenmeden, üç ayrı sabah anal bant örneğinin alınması) olası olmadığında *E. vermicularis* tanısı çoğu kez atlanmakta, ev ve okul içi salgınlara yol açabilmektedir. Çocuklarda *E. vermicularis*'in çoğunlukla anal kaşıntı, uykusuzluk, huzursuzluk gibi yakınmalar yanında ender olarak idrar yolu enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilmesi, ev içi diğer bireylere kolaylıkla bulaşabilmesi nedeniyle tanısı önem taşımaktadır<sup>(1,2,9)</sup>. Keza, *Taenia* spp. enfeksiyonlarının kişide zaman zaman gastrointestinal yakınmalara yol açmasına rağmen genelde sessiz karakteri, ülkemizde nadir görülse de *T. solium* larva enfeksiyonlarının ölümcül beyin tutulumuna neden olabilmesi nedeniyle tenyalar için de etkin bir tanı seçeneği gerekmektedir<sup>(1,2,20)</sup>. Burada geliştirdiğimiz ikili PZR protokolünde herhangi bir tenya türü ile enfekte bireyler saptanabilecek, sessiz enfeksiyonlar belirlenebilecektir.

Sonraki dönemde bu yöndeki çalışmalarımıza devam etmeyi, öncelikle *A. lumbricoides* - *S. stercoralis* ikili protokolüne *T. trichiura*'yı ve sonrasında kancalı kurtları ekleyerek çoklu PZR protokolünün geliştirilmesini ve tanısal etkinliğinin artırılmasını hedeflemekteyiz. Sonrasında optimizasyonu tamamlanmış protokollerin hasta ve sağlıklı insanlara ait dışkı örneklerindeki tanısal etkinliklerinin yeni bilimsel çalışmalarla araştırılmaları, tanısal duyarlılık ve özgüllük düzeylerinin belirlenmesi öncelikli hedef olacaktır. Günümüzde yalnızca intestinal helmintleri değil, insanlarda ishale yol açan tüm mikrobiyal etkenleri bir arada saptamayı hedefleyen ticari kitler geliştirilmiş durumdadır<sup>(35)</sup>. Benzer

çalışmaların artması ve çoklu PZR uygulamalarının yaygınlaşmasıyla intestinal helmintlerin toplumdaki epidemiyolojik yaygınlıkları ve klinik rolleri daha iyi anlaşılacak, hastalara tedavi başlanma süresi kısaltarak paraziter hastalıklarla mücadele daha etkin yürütülebilecektir.

**Etik Kurulu Onayı:** Bu çalışma için Etik Kurul onayı gerekli olmadığından alınmamıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Teşekkür:** Çalışmada kullanılan helmintlere ait DNA örneklerini (kimlikleri saklı hâlde) bizimle paylaşan Danimarka Kopenhag'daki Statens Serum Enstitüsü'nden Dr. Rune Stensvold'a teşekkür ederiz.

**Finansal Destek:** Bu araştırma İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 50980 No.lu proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** No ethical approval was received for this study as not required.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Acknowledgement:** We thank to Dr. Rune Stensvold from Statens Serum Institute in Copenhagen-Denmark for sharing the DNA samples of the helminths in the study (anonymously).

**Funding:** Istanbul University Commission of Scientific Research Projects (Project No: 50980).

## KAYNAKLAR

- Garcia LS, Bruckner DA. Clinically Important Human Parasites. In: Diagnostic Medical Parasitology (3rd ed.). Washington DC: American Society for Microbiology, 1993;3-307.
- Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Bölüm VII: Sindirim sisteminde görülen helmint hastalıkları. In: Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:22. İzmir: Meta Basım, 2007;669-773.
- Polat E, Özdemir S, Sirekbasan S. İstanbul'da bir üniversite hastanesine başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı: Yedi yıllık retrospektif analiz. Türkiye Parazit Derg. 2020;44(3):139-42. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6653>
- Taş Cengiz Z, Yılmaz H, Beyhan YE, Çiçek M. Geniş kapsamlı bir retrospektif çalışma: Van yöresinde insanlarda intestinal parazitler. Türkiye Parazit Derg. 2019;43(2):70-3. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.5997>
- Ergüden Gürbüz C, Gülmez A, Özkoç S ve ark. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2011-2018 yılları arasında saptanan bağırsak parazitlerinin dağılımı. Türkiye Parazit Derg. 2020;44(2):83-7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6662>
- Özyurt M, Kurt Ö, Yaman O, Ardıç N, Haznedaroğlu T. Bir eğitim hastanesi koproloji laboratuvarında geçen dört yıllık dönemde saptanan bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. Türkiye Parazit Derg. 2007;31(4):306-8.
- Limoncu ME, Ok ÜZ. Taze dışkı örneğinin toplanması, tespit edilmesi ve nakli. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (ed.). Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Meta basım, 2011;9-16.
- Kilimcioğlu AA, Ok ÜZ. Makroskobik inceleme ve taze dışkı incelemeleri. In: Korkmaz M, Ok ÜZ (ed.). Parazitolojide laboratuvar. İzmir: Meta basım, 2011;17-22.
- Patmano M, Gümüşt T, İlhan Türkel F. A rare cause of acute appendicitis: *Enterobius vermicularis*. Türkiye Parazit Derg. 2021;45(3):220-2. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.6731>
- de Lima Corvino DF, Horrall S. Ascariasis. [Updated 2021 Oct 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. (Erişim Tarihi: Ocak 2022)
- Ozdemir O. Loeffler's syndrome: A type of eosinophilic pneumonia mimicking community-acquired pneumonia and asthma that arises from *Ascaris lumbricoides* in a child. North Clin Istanbul. 2020;7(5):506-7. <https://doi.org/10.14744/nci.2020.40121>
- Ojha SC, Jaide C, Jinawath N, Rotjanapan P, Baral P. Geohelminths: public health significance. J Infect Dev Ctries. 2014;8(1):5-16. <https://doi.org/10.3855/jidc.3183>
- Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. Erciyes Üni Vet Fak Derg. 2011;8(1):43-51.
- Gough R, Ellis J, Stark D. Comparison and recommendations for use of *Dientamoeba fragilis* real-time PCR assays. J Clin Microbiol. 2019;57(5):e01466-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01466-18>



15. Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):461-86. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.02.006>
16. Khurana S, Singh S, Mewara A. Diagnostic techniques for soil-transmitted helminths- recent advances. *Res Rep Trop Med*. 2021;12:181-96. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S278140>
17. Viswanath A, Williams M. "Trichuris Trichiura (Whipworm, Roundworm)". StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018. (Erişim Tarihi: Ocak 2022)
18. Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Correa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol*. 2002;24(11-12):499-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00600.x>
19. Tokmak N, Koc Z, Uluşan S, Koltas IS, Bal N. Computed tomographic findings of trichuriasis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(26):4270-2. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i26.4270>
20. Pawlowski ZS, Murrell KD. Taeniasis and Cysticercosis. In: *Foodborne Disease Handbook* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press, 2018.
21. Aung AK, Spelman DW. *Taenia solium*, taeniasis and systicercosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(5):947-54. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0684>
22. Vasquez-Rios G, Pineda-Reyes R, Pineda-Reyes J, Marin R, Ruiz EF, Terashima A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. *J Parasit Dis*. 2019;43(2):167-75. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01090-x>
23. Gunathilaka N, Chandrasena N, Wijerathna T, et al. Descriptive investigation of strongyloidiasis Infection and characterization of *Strongyloides stercoralis* using morphological and molecular-based methods. *Case Rep Infect Dis*. 2020;2020:5431491. <https://doi.org/10.1155/2020/5431491>
24. Hii SF, Senevirathna D, Llewellyn S, et al. Development and evaluation of a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction for hookworm species in human stool. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(5):1186-93. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0276>
25. Zhu GQ, Li L, Ohiolei JA, et al. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Taenia hydatigena*, *T. multiceps*, *T. pisiformis*, and *Dipylidium caninum* infections. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):854. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4512-3>
26. Sanprasert V, Kerdkaew R, Srirungruang S, Charuchaibovorn S, Phadungsaksawasdi K, Nuchprayoon S. Development of conventional multiplex PCR: A rapid technique for simultaneous detection of soil-transmitted helminths. *Pathogens*. 2019;8(3):152. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030152>
27. Tilmanne A, Martiny D, Quach C, et al. Enteropathogens in paediatric gastroenteritis: comparison of routine diagnostic and molecular methods. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(12):1519-24. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.07.021>
28. Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl1):67-9. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000900013>
29. Sürmeli A, Tolunay T, Yasin Y, et al. Child health, parasites and lower socioeconomic status: Outcomes of a long-term screening, intervention and training study by health volunteers in rural Nepal. *Acta Trop*. 2020;202:105263. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105263>
30. Balcioglu IC, Kurt O, Limoncu ME, et al. Rural life, lower socioeconomic status and parasitic infections. *Parasitol Int*. 2007;56(2):129-33. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.01.005>
31. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(1): 232-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.232-235.2006>
32. Mbong Ngwese M, Prince Manouana G, Nguema Moure PA, Ramharter M, Esen M, Adégnika AA. Diagnostic techniques of soil-transmitted helminths: Impact on control measures. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):93. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020093>
33. Oktar N, Ozer HM, Demirtas E. Central nervous system *Strongyloides stercoralis*. A case report. *Turk Neurosurg*. 2020;30(5):776-9. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.22886-18.2>
34. Nazik S, Yıldız F. A case of rheumatoid arthritis with *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 2020;44(2):112-4. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6222>
35. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ GI-Helminth(I) Assay, the first marketed multiplex PCR for helminth diagnosis. *Parasite*. 2021;28:33. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021034>