

# Boğmaca Tanısında IS481 Genini Hedefleyen İki Ticari Kiti Performansının Değerlendirilmesi

## Evaluation of the Performance of Two Commercial Kits Targeting the IS481 Gene in Pertussis Diagnosis

Hatice Yazısız\*<sup>1</sup>, Aydan Karagül\*\*<sup>2</sup>, Özlem Koyuncu Özyurt\*<sup>3</sup>, Betil Özhak\*<sup>4</sup>, Kenan Midilli\*\*\*<sup>5</sup>, İmran Sağlık\*\*\*\*<sup>6</sup>, Gözde Öngüt\*<sup>7</sup>, Mert Ahmet Kuşkucu\*\*\*\*<sup>8</sup>, Dilara Ögünç\*<sup>9</sup>

\* Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

\*\* Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Antalya, Türkiye

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

\*\*\*\* Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

**Atf/Cite as:** Yazısız H, Karagül A, Koyuncu Özyurt Ö, et al. Boğmaca tanısında IS481 genini hedefleyen iki ticari kiti performansının değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2023;53(2):99-106.

### Öz

**Amaç:** Boğmaca karakteristik öksürük ile ayırt edilen oldukça bulaşıcı akut solunum yolu hastalığıdır. Vakaların çoğunda Bordetella pertussis etkidir. Kültür, antijen saptama, polimeraz zincir reaksiyonu ve serolojik yöntemler tanıda kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı boğmaca teşhisi için IS481 genini hedefleyen iki ticari polimeraz zincir reaksiyonu testinin performansını değerlendirmektir.

**Yöntem:** Bu çalışmaya klinik olarak pertussis düşünülen 77 hastanın nazofaringeal aspirat örneği alındı. Numuneler uygun besiyerlerine ekildi. Bordetella pertussis tespiti için örnekler üç farklı polimeraz zincir reaksiyonu testi ile değerlendirildi: Diagenode Bordetella pertussis ve parapertussis gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kiti (Diagenode Diagnostics, Liège, Belçika), BORDETELLA R-gene™ kiti (Argene, Verniolle, Fransa) ve konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu testi. Gerçek pozitif ve gerçek negatif sonuçlar ile iki gerçek zamanlı polimeraz zincir sonuçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya katılanların yaşları 10-50 arasında (Ortalama yaş 26.5±9.2 yıl) değişmekteydi. Boğmacalı hastalarda paroksizmal öksürük ve kusma sıklığı istatistiksel olarak daha yüksekti. Bordetella pertussis kültürü üç örnekte (%3.9) pozitifti. BORDETELLA R-gene™ kitinin pozitif yüzde uyumu ve negatif yüzde uyumu sırasıyla %100 ve %97 idi. Diagenode Bordetella pertussis ve parapertussis gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kitinin pozitif yüzde uyumu ve negatif yüzde uyumu sırasıyla %91 ve %100 olarak hesaplandı.

**Sonuç:** Her iki gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ticari kitinin Bordetella pertussis tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü literatürde bildirilen oranlarla benzerdir. Testler arasındaki uyum ve korelasyon katsayısı da yüksektir.

**Anahtar kelimeler:** Boğmaca, Bordetella pertussis, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

### ABSTRACT

**Objective:** Pertussis is a highly contagious acute respiratory disease distinguished by its characteristic cough. Bordetella pertussis is the causative agent in most of the cases. Culture, antigen detection, polymerase chain reaction and serological methods are used in diagnosis. The aim of this study was to evaluate the performance of two commercial polymerase chain reaction tests targeting the IS481 gene for the diagnosis of pertussis.

**Methods:** Nasopharyngeal aspirate samples of 77 patients with clinically suspected pertussis were included in this study. The samples were cultivated in appropriate media and assessed with three different polymerase chain reaction tests for the detection of Bordetella pertussis: Diagenode Bordetella pertussis and parapertussis real-time polymerase chain reaction kit (Diagenode Diagnostics, Liège, Belgium), BORDETELLA R-gene™ kit (Argene, Verniolle, France) and conventional polymerase chain reaction test. The true positive and true negative results were compared with the results of two real-time polymerase chain reaction.

**Results:** The ages of the study participants ranged from 10-50 years (Mean age 26.5±9.2 years). The frequencies of paroxysmal cough and vomiting were statistically higher in patients with pertussis. Bordetella pertussis culture were positive in three (3.9%) samples. The positive and negative percent agreements of BORDETELLA R-gene™ kit were 100% and 97%, respectively. The positive and negative percent agreements of Diagenode Bordetella pertussis and parapertussis real-time polymerase chain reaction kits were calculated as 91% and 100%, respectively.

**Conclusion:** The sensitivity and specificity of both real-time polymerase chain reaction commercial kits in the diagnosis of Bordetella pertussis are similar to the rates reported in the literature. The agreement and correlation coefficient between the tests are also high.

**Keywords:** Pertussis, Bordetella pertussis, real-time polymerase chain reaction

**Alındığı tarih / Received:**

21.07.2022 / 21.July.2022

**Kabul tarihi / Accepted:**

07.03.2023 / 07.March.2023

**Yayın tarihi / Publication date:**

01.06.2023 / 01.June.2023

### ORCID Kayıtları

H. Yazısız 0000-0002-7285-4764

A. Karagül 0000-0002-2276-4648

Ö. Koyuncu Özyurt 0000-0003-1260-0671

B. Özhak 0000-0001-5224-1824

K. Midilli 0000-0003-3007-3422

İ. Sağlık 0000-0003-0864-4989

G. Öngüt 0000-0003-2808-1829

M. A. Kuşkucu 0000-0001-8735-5725

D. Ögünç 0000-0001-6669-6811

✉ betilozhak@yahoo.com

## GİRİŞ

Boğmaca karakteristik öksürük ile ayırt edilen oldukça bulaşıcı akut solunum yolu hastalığıdır. Vakaların çoğuna *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) neden olurken, bazılarında *Bordetella parapertussis* neden olur<sup>(1)</sup>. *B. pertussis* küçük, aerobik, gram negatif kokobasil yapısında boğmaca hastalığına neden olan bir bakteridir. Her yaştaki duyarlı bireyleri etkilemekle beraber, özellikle yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde ağır seyreden akut, bulaşıcı bir solunum sistemi hastalığıdır<sup>(2)</sup>.

Aşılama sonrasında boğmaca hastalığı önemli derecede azalmış olmasına rağmen, halen tüm dünyada, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde, önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir<sup>(2)</sup>. WHO verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 151.000'den fazla boğmaca vakası görülmüştür. Boğmacalı kişilerin, öksürük başladıktan yaklaşık üç hafta sonrasına kadar en bulaştırıcı oldukları dönemdir ve enfeksiyona yakalanan çocukların çoğunda 4-8 hafta süren öksürük nöbetleri olmaktadır<sup>(3)</sup>.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'na göre bir kişide en az iki hafta süren öksürüğe; şiddetli öksürük nöbetleri, iç çekmeli solunum, öksürükten hemen sonra kusma olması ve öksürüğe neden olabilecek başka bir sorun (pnömoni, plörezi, sinüzit gibi) bulunmaması kriterlerinden birinin eşlik etmesi olası vaka olarak tanımlanırken; olası vaka kriterlerine ek olarak nazofaringeal örneklerden *B. pertussis* izolasyonu veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *B. pertussis* geninin saptanması durumunda kesin vaka olarak tanımlanmaktadır<sup>(4)</sup>. Boğmaca hastalığında klinik özellikler tipik olduğunda dikkatli anamnez ve fizik muayene ile tanı konabilir ama atipik olgularda klinik tanıda güçlükler vardır. Erişkinler ve adolesanlarda boğmaca hastalığı atipik semptomlar ve uzun süren öksürükle birlikte olduğunda bulaştırmada etkili olduklarından, bu grupta erken tanı koymak önemlidir. Uzamış öksürüğü olan olgularda tanıyı doğrulamak için de laboratuvar testleri yapılmalıdır. Laboratuvar testleri; karakteristik semptomları ve bulguları olmayan vakalarda, sporadik olgularda ve epidemiyolojik araştırmalarda yararlı olmaktadır<sup>(5)</sup>.

Boğmaca tanısında kullanılan testler; kültür, antijen saptama, PZR ve serolojik yöntemlerdir. Bu testler arasında yalnızca kültür ve PZR, ulusal bildirim için bir vakanın laboratuvar doğrulaması kriterlerini karşılar<sup>(4)</sup>. Kültür %100 spesifik bir yöntem olmasına karşın rutin uygulamada genellikle yerini PZR yöntemine bırakmıştır. Kültürün ve PZR yönteminin duyarlılığı hastanın yaşı, semptomlarının süresi, aşılama durumu ile ilişkilidir. Üç haftadan fazla öksürüğü olan adolesan ve erişkinlerde kültür duyarlılığı %1'in altında iken birkaç gün süreyle semptomu bulunan aşısız infantlarda duyarlılık yaklaşık %60'dır. PZR yönteminin duyarlılığı kültürden 2-6 kat fazladır<sup>(5)</sup>. Yakın zamana kadar boğmaca tanısında altın standart yöntem *B. pertussis*'in solunum kültüründe pozitif saptanmasıydı. PZR testi "yeni" altın standarttır ve özellikle hafif semptomatik olan, antibiyotik almış bireylerde daha hızlı sonuç vermesi ve kültürden daha duyarlı görünmesi nedeniyle boğmaca tanısında artık daha yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(6)</sup>. Konvansiyonel PZR, seminested PZR, gerçek zamanlı PZR ve loop-mediated isothermal amplification (LAMP) testleri dahil olmak üzere *Bordetella*'yı tespit etmek için çok sayıda PZR testi bulunmaktadır. Birçok çalışma, *Bordetella* genomlarında çoklu kopyaların bulunması nedeniyle, IS (Insertion sequence) elementlerini hedefleyen PZR'lerin oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir<sup>(7)</sup>. IS elementleri genellikle genomlarda çok sayıda kopya halinde bulunur ve PZR için mükemmel hedeflerdir. IS481 *B. pertussis* için spesifik olduğu varsayılrsa da *Bordetella holmesii* izolatlarında ve bazı *Bordetella bronchiseptica* izolatlarında da bulunur. IS1001 *B. parapertussis* suşlarının tümünde, bazı *B. bronchiseptica* suşlarında bulunurken *B. pertussis* bu geni içermez. IS481 *B. pertussis*'in PZR ile saptanması için en çok kullanılan hedefdir<sup>(8)</sup>.

Bu çalışmada boğmaca tanısı için IS481 genini hedefleyen iki ticari PZR testinin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (21.09.2010 tarih ve 84-121 karar numarası) onaylanmış ve Helsinki Deklarasyonu Kuralları'na uygun olarak yapılmıştır.

Hasta Seçimi ve Örnek Alınması: Çalışmaya Ekim 2010-Mayıs 2011 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hastalıkları ve Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerine başvuran iki haftadan uzun süren öksürük şikâyeti bulunan ve aşı takvimine uygun boğmaca aşılı yapılan 77 hasta dahil edilmiştir. Astım, tümör, pasif sigara içiciliğine bağlı öksürük, kistik fibrozis, sinüzite bağlı öksürük, apse, bronşektazi ve ilaç alımına bağlı ve iki haftadan az süren öksürüğü olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. Hastalardan nazofarengeal sürüntü (Copan Eswab, İtalya) örneği alınarak içinde modifiye amies medium olan hazır taşıma besiyerine konularak laboratuvara ulaştırılmıştır.

Laboratuvar Testleri: Tüm testlerde kalite kontrol suşu olarak *Bordetella pertussis* ATCC 9797 kullanılmıştır.

Kültür: Laboratuvara gelen örneklerin Charcoal agar (Oxoid, Birleşik Krallık) besiyerine kültür ekimi yapılan plaklar nemli atmosferde 37°C'de inkübe edilerek 72 saatlik inkübasyonun ardından toplam yedi gün boyunca her gün agar plakları incelenmiş ve süre sonunda üreme gözlenmediyse "üreme olmadı" şeklinde kaydedilmiştir. Üreyen şüpheli kolonilerin sefalekssin içermeyen Charcoal agara pasajları yapılmıştır. Kolonilerin Gram boyama ile morfolojik özellikleri, katalaz, oksidaz, üreaz reaksiyonları, Mac Conkey agarda üreme, sitrat kullanımı, hareket, *B. pertussis* antiserum (Remel *Bordetella Pertussis* Agg. Sera) ile aglutinasyon verme özellikleri ve direkt floresan antikör (DFA) testi kullanılarak tanımlamaları yapılmıştır.

PZR: Örnekler PZR testleri için çalışma zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır. Örnekler BD Max sisteminde (Becton, Dickinson, Franklin Gölü, ABD) çalışılan Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kit (Diagenode Diagnostics, Liège, Belçika), *BORDETELLA* R-gene™ kit (Argene, Verniolle, Fransa) ve *B. pertussis*'in saptanmasında ayrı bir konvansiyonel PZR olmak üzere üç farklı PZR testi ile değerlendirilmiştir.

Örneklerin DNA izolasyonu MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Almanya) ile MagNA Pure LC otomatize izolasyon sisteminde yapılmıştır.

*BORDETELLA* R-gene™ gerçek zamanlı PZR kiti: *BORDETELLA* R-gene™ kit (Argene, Verniolle, Fransa) solunum yolu doku örneklerinde (nazofarenks aspirasyonu ve balgam) çalışılan *B. pertussis*'de bulunan *IS481* dizisi içeren *Bordetella* bakterilerinin saptanmasını sağlayan bir kittir. Rotor-Gene 6000 (Corbett research, Avusturalya) cihazında PZR işlemi yapılmıştır. Validasyon için gerekli koşulların yerine gelmesi ile test geçerli sayılmıştır. Testinin sonucu, döngü eşiği (Ct) değerlerine göre değerlendirilmiştir. Bir numune, Ct değeri <35 ise pozitif, 35 ile 40 arasında ise intermediate, ≥ 40 ise negatif olarak kabul edilmiştir.

Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kit (Diagenode Diagnostics, Liège, Belçika): BD MAX™ sisteminde çalışılan nazofaringeal aspiratlarda ve boğaz sürüntülerinden direkt kalitatif *B. pertussis* tespiti için kullanılan gerçek zamanlı PZR kitidir. Test, sırasıyla *IS481* ve *IS1001* dizilerinde *B. pertussis* ve *B. parapertussis* genlerinin amplifikasyonu için gerçek zamanlı PZR kullanır. Bu kit nazofaringeal aspiratlarda *B. parapertussis*'in saptanmasına da izin verir ancak tanı amaçlı kullanılmaz, boğmaca tanısında yardımcı olarak tasarlanmıştır.

Konvansiyonel PZR yöntemi: PZR çalışması için literatürde bildirilen ve *B. pertussis* *IS481* bölgelerine ait primer çiftleri kullanılmıştır<sup>(9)</sup>. Liyofilize halde ticari olarak temin edilen primer dizileri Tablo 1'de, kullanılan PZR karışımı Tablo 2'de verilmiştir. PZR ürünleri yatay %1.5 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon, PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., MA, ABD)'da gerçekleştirilmiştir (Tablo 3).

İki farklı ticari gerçek zamanlı PZR kitleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde, konvansiyonel PZR testi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde çalışılmıştır.

**Tablo 1. Konvansiyonel PZR yönteminde kullanılan primerler**

Gen	İsmi	Dizisi	Ürün boyutu
IS481	BP1	5- GAT TCA ATA GGT TGT ATG CAT GGT T-3	215 bp
	BP2	5- ACA GTC GGC GCG GTG ACC CC-3	

**Tablo 2. Bordetella pertussis IS481 için PZR karışımı (kullanılan reaktifler ve miktarları)**

Bileşen	Miktar (µl)	Konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen su	14.375	25 ml (son reaksiyon hacmini tamamlamak için)
10X-PCR Buffer	2.5	1x
MgCl <sub>2</sub>	1.5	
dNTP	0.5	200 mM
BP1	0.5	
BP2	0.5	Primerin son konsantrasyonu 25 mM
Taq-Polimeraz	0.125	0.625 U
Toplam Mix	20	
Örnek DNA'sı	5	
Toplam reaksiyon hacmi	25	

**Tablo 3. Amplifikasyon aşamaları**

Aşama	Sıcaklık	Süre (Dakika)	Tanım
1. Bekleme	94°C	05.00	Denatürasyon
	95°C	0.30	
2. PZR Aşaması	55°C	1.00	45 Döngü, PZR ile çoğaltma
	72°C	01.00	
3. Bekleme	72°C	02.00	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	4°C	Sonsuz	Yürütme aşamasına kadar saklamak için

Çalışmaya alınan 77 hasta örneği her iki ticari kit ile çalışılmıştır. Bu iki kit ile intermediate veya pozitif sonuçlanan örneklerle (n=43) konvansiyonel PZR testi çalışılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi: Kültürde üreme olması veya üç moleküler testten ikisinde test pozitifliği gerçek pozitiflik olarak kabul edilmiştir. Üç moleküler testten ikisinin negatif olması durumunda sonuç negatif olarak kabul edilmiştir. Çalıştığımız hasta grubunda kültürün duyarlılığı düşük olduğu için FDA'nın önerileri doğrultusunda "pozitif yüzde uyum" ve "negatif yüzde uyum" değerleri hesaplanmıştır<sup>(10)</sup>.

İstatistiksel Değerlendirme: İstatistiksel değerlendirme için PASW Statistics for Windows, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD) versiyonu kullanılmıştır. Değişkenleri değerlendirmek için ortalama, standart sapma, sıklık ve yüzde gibi tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. "Pozitif yüzde uyum" (Positive percent agreement, PPA) ve "negatif yüzde uyum" (Negative percent agreement, NPA) değerleri hesaplanmıştır. Kategorik verileri karşılaştırmak için ki-kare testi kullanılmıştır. Tanı testleri arasındaki uyum kappa değeri ile, korelasyonlar Spearman's korelasyon testleri ile karşılaştırılmıştır. P değeri <0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya katılan hasta ve temaslıların yaşları 10-50 yaş arasında (Ortalama yaş  $26.5 \pm 9.2$  yıl) değişmekteydi. Hastaların % 17.1'si çocuk; % 82.9'u yetişkin yaş grubunda idi. Olguların 38 (%49.4)'i erkek, 39 (%50.6)'u kadındı. Paroksizmal öksürük 37 (%48.1) hastada, kusma 22 (%28.6) hastada, antibiyotik kullanımı 49 (%63.6) hastada vardı. Örnekler hastaların çoğunda (n=69, %89.6) 2-4 haftalarda alınmış olup sadece bir hastada semptomların 12. haftasında örnek alınmıştır.

Bir hasta üç PZR testi ve kültür sonuçlarına göre karşılaştırmalı tanı doğruluğu ve gerçek pozitiflerin belirlenmesi kriterlerini karşılamadığı için analizlere dahil edilmedi. Kalan 76 hastanın 32'si (%42.1) (çocuk hastaların %0.4'ü; yetişkin hastaların % 42.9'u) belirlenen kriterlere göre *B. pertussis* pozitif olarak kabul edilmiştir. *B. pertussis* pozitif olarak kabul edilen hastalarda cinsiyet ( $p=0.509$ ) antibiyotik kullanım sıklığı ( $p=0.507$ ) ve numune alım haftaları ( $p=0.493$ ) açısından fark saptanmamıştır. Bu hastalarda paroksizmal öksürük sıklığı [%62.5 (20/32) karşın %38.6 (17/44), ( $p=0.04$ )] ve kusma sıklığı [%50 (16/32) karşın %13.6 (6/44), ( $p=0.001$ )] istatistiksel olarak daha yüksekti.

Örneklerin sadece üçünde (%3.9) kültürde üreme saptanmıştır. Konvansiyonel PZR çalışılan toplam 43 örneğin 33'ü pozitif 10'u negatif olarak saptanmıştır. *BORDETELLA* R-gene™ kiti ile örneklerin %33'ü pozitif, %46'sı negatif ve %21'i intermediate olarak; Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kiti ile %38'i pozitif ve %62'si negatif olarak saptanmıştır. Bu iki testin uyumu (Kappa değeri 0.55), korelasyon katsayısı ( $r=0.586$ ,  $p<0.001$ ) yüksek bulunmuştur.

*BORDETELLA* R-gene™ kitinin pozitif yüzde uyum ve negatif yüzde uyum değerleri %100 ve %97 iken bu değerler Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kiti için %91 ve %100 olarak saptanmıştır (Tablo 4).

## TARTIŞMA

*Bordetella pertussis* saptanması için kültür altın standart olarak kabul edilmiştir, özgüllüğü yüksek ancak genellikle duyarlılığı düşüktür ve sonuç vermek için 4-5 gün gerekli olur. Kültürün bu dezavantajları nedeniyle boğmaca tanısında daha hızlı güvenilir tanı yöntemleri araştırılmıştır<sup>(11)</sup>.

Yapılan çalışmalarda PZR yöntemlerinin boğmaca tanısında kültürden daha duyarlı olduğu

**Tablo 4. BORDETELLA R-gene™ kit ve Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kiti sonuçlarının karşılaştırılması**

	Toplam (n=76)	Hasta (n=32)	Hasta değil (n=44)	Pozitif yüzde uyum (PPA)	Negatif yüzde uyum (NPA)
<b>PZR 1</b>					
Pozitif	25 (%33)	24 (%75)	1 (%2.3)		
Intermediate	16 (%21)	8 (%25)	8 (%18.2)	%100	%97
Negatif	35 (%46)	0 -	35 (%79.5)		
<b>PZR 2</b>					
Pozitif	29 (%38)	29 (%91)	0 -		
Negatif	47 (%62)	3 (%9)	44 (%100)	%91	%100

PZR 1: *BORDETELLA* R-gene™ kit

PZR 2: Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR kit

bildirilmiştir<sup>(12,13)</sup>. Templeton ve arkadaşlarının 57 klinik örnekte gerçek zamanlı PZR, konvansiyonel PZR ve kültür yöntemleri kullanılarak yaptıkları çalışmada %14 kültür, %33 konvansiyonel PZR, %39 gerçek zamanlı PZR ile pozitiflik bulunmuş; *B. pertussis* enfeksiyonu için bir klinik standartla karşılaştırıldığında, kültür, konvansiyonel PZR ve gerçek zamanlı PZR için duyarlılık sırasıyla %38, %83 ve %100 ve özgüllük %100, %97 ve %97 saptanmıştır. Bu çalışmada, gerçek zamanlı PZR'nin geleneksel PZR'den daha fazla duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir<sup>(12)</sup>. Nazofaringeal sürüntü örneklerinde *B. pertussis*'in saptanması için gerçek zamanlı PZR testinin konvansiyonel PZR ile karşılaştırıldığı çalışmada iki testin pozitiflik oranlarında önemli ölçüde fark saptanmadığı bildirilmiştir ( $p=0.0654$ )<sup>(14)</sup>. Simplexa™ Bordetella Direct assay (DiaSorin Molecular) ile 1103 nazofaringeal sürüntü örneğinde yapılan çalışmada *B. pertussis* için genel pozitif yüzde uyumu ve negatif yüzde uyumu sırasıyla %98.7 ve %97.3 olarak bildirilmiştir<sup>(15)</sup>. Nazofaringeal aspirat ( $n=128$ ) ve boğaz sürüntü örneklerinde ( $n=162$ ) BD Max sistemi üzerinde Diagenode multipleks PZR testiyle yapılan çalışmada, nazofaringeal aspirat için sırasıyla duyarlılık ve özgüllük %97.3 ve %100 ve boğaz sürüntü örnekleri için %88.3 ve %98 olarak saptanmıştır<sup>(16)</sup>. Yapılan çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da *BORDETELLA R-gene™* ve Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* PZR testlerinin performansının (pozitif yüzde uyum ve negatif yüzde uyum sırasıyla %100, %97; %91, %100) yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu iki testin uyumu (Kappa değeri 0.55) ve korelasyon katsayısı ( $r=0.586$ ,  $p<0.001$ ) yüksek bulunmuştur.

*Bordetella pertussis*'in PZR yöntemiyle saptanmasında hedef olarak bir dizi kromozomal bölge kullanılmaktadır. *B. pertussis*'in saptanmasında en sık kullanılan hedef olan *IS481* her hücrede çok kopya halinde bulunduğundan, bu hedefin kullanılması tek kopya halinde bulunan hedeflerin kullanılmasına göre PZR'in analitik duyarlılığının daha yüksek olmasını sağlar. Ancak bu bölgenin kullanılması ile ilgili sorun özgüllüğü ve kontaminasyon ile ilgilidir. *IS481 B. parapertussis* dışında diğer *Bordetella* türlerinde de bulunur; *B. holmesii* ve *B. brochiseptica*'nın insan izolatlarından bazılarında saptanmıştır<sup>(8)</sup>. Sloan ve ark.'nın<sup>(14)</sup> görüşüne göre *IS481* tarafından sağlanan

*B. pertussis* tespitine yönelik duyarlılığın yüksek olması özgüllükle ilgili sınırlılıklarından daha ağır basmaktadır. PZR ile *B. pertussis IS481* DNA'sı için pozitif olan numuneler, pertussis toksin gen (PTG) gibi başka bir hedefi kullanan ikinci bir PZR analizine tabi tutulabilir; ancak, PTG hedefinin daha az duyarlı bir hedef olduğu göz önüne alındığında, bu yaklaşımın kullanımı sınırlıdır<sup>(14)</sup>. Bazı çalışmalar *IS481*'e ek olarak PTG kullanarak sonuçları yorumlamıştır<sup>(17,18)</sup>. Bizim çalışmamızda kullanılan iki ticari kit ve bir konvansiyonel yöntemde *IS481* kullanılmış, ek olarak başka hedefi kullanan bir PZR testi çalışılmamıştır.

Ülkemizde boğmaca tanısında kullanılan testler ile ilgili daha çok serolojik çalışmalar bulunmakla beraber moleküler çalışmalar da bulunmaktadır. Özbek ve ark.'nın<sup>(19)</sup> Manisa ilindeki pertussis toksin antikor seroprevalansını araştırdıkları ergen ( $\geq 10$  yaş) ve erişkin yaştaki toplam 1116 katılımcının 21 (%1.8)'i olası akut enfeksiyon veya son zamanlarda geçirilmiş enfeksiyon tanımına (anti-PT IgG  $>100$  IU/ml) uygun olarak saptanmıştır. Olguların iki farklı yaş grubunda yoğunlaştığı gözlenmiştir. Tüm ergen ve erişkinler arasında 15 yaş %13.6'lık olgu ve %77.3'lük seropozitiflik düzeyi ile antikor varlığı değerlendirmesinde ilk sırada tespit edilmiştir. Tanıma uygun olguların ikinci kez ileri yaşlarda (60-69) yoğunlaştığı görülmüştür<sup>(19)</sup>. Öksüz ve ark.'nın<sup>(20)</sup> 410 çocuk hastada yaptığı çalışmada *Bordetella* PZR pozitiflik oranları 2010 yılında %36, 2011 yılında %29, 2012 yılında %15 ve 2013 yılında %15 olarak bildirilmiştir. Kültürle pozitiflik oranı düşük olmasına rağmen (%1.4), PZR yöntemiyle %26 oranında pozitif saptanmıştır<sup>(20)</sup>. Tamburacı Uslu ve ark.'nın<sup>(21)</sup> yaptığı boğmacanın ev içi bulaşını tespit etmenin amaçlandığı ve gerçek zamanlı PZR ile boğmaca şüphesi olan 173 bebek ve 107 ailenin test edildiği çalışmada sırasıyla %27.7, %39.3 oranında pozitiflik saptanmıştır. Akut bronşiolit nedeniyle hastaneye yatırılan, 6 aylıktan küçük toplam 172 bebeğin gerçek zamanlı PZR ile yapılan çalışmada %25.6 oranında pozitiflik saptanmıştır. *B. pertussis* enfeksiyonunun akut bronşiolit nedeniyle hastaneye yatırılan küçük bebeklerde, yaygın olduğu ve bebeklerde boğmacanın klinik özellikleri karakteristik olmadığı belirtilmiştir<sup>(22)</sup>. Bölgemizde 214 ergen ve yetişkinin alındığı çalışmada %7 ve %5 oranında pozitiflik saptanmıştır<sup>(17)</sup>.

Sonuç olarak %17.1'si çocuk; %82.9'u yetişkin yaş grubunda olan 77 hastada yapılan çalışmada 32'sine belirlenen kriterlere göre *Bordetella* teşhisi konulmuştur. *Bordetella* teşhisi konulan hastalarda paroksizmal öksürük ve kusma sıklığı istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır. Kültür ekimi yapılan örneklerin sadece üçünde (%3.9) üreme saptanmıştır. BORDETELLA R-gene™ kit ve Diagenode *Bordetella pertussis* ve *parapertussis* gerçek zamanlı PZR testlerinin pozitif yüzde uyum ve negatif yüzde uyum değerleri sırasıyla; %100, %97; %91, %100 olarak saptanmıştır. Ayrıca bu iki testin uyumunun da yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (21.09.2010 tarih ve 84-121 karar numarası) onaylanmış ve Helsinki Deklarasyonu Kuralları'na uygun olarak yapılmıştır.

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

**Finansman:** Yoktur/bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Akdeniz University, School of Medicine Ethics Committee (09.21.2010; 84-121). It was conducted in accordance with the Rules of the Declaration of Helsinki.

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

**Funding:** None/not declared.

## KAYNAKLAR

1. Nieves DJ, Heining U. *Bordetella pertussis*. Microbiol Spectr. 2016;4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.E110-0008-2015>
2. Long SS. Pertussis. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia: Saunders Company; 2004:908-12.
3. World Health Organization. [[https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_1)] (Erişim tarihi: Haziran 2022).
4. T.C. Sağlık Bakanlığı. Boğmaca hastalığının kontrolü için saha rehberi. Ankara: 2003. [<https://denizliism.saglik.gov.tr/Eklenti/9563/0/bogmaca-saha-rehberipdf.pdf>] (Erişim tarihi: Haziran 2022).
5. Kilgore PE, Coenye T. *Bordetella* and Related Genera. In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology. 12th ed. Washington, DC: ASM Press; 2019:858-70.
6. Daniels HL, Sabella C. *Bordetella pertussis* (Pertussis). Pediatr Rev. 2018;39(5):247-57. <https://doi.org/10.1542/pir.2017-0229>
7. van der Zee A, Schellekens JF, Mooi FR. Laboratory diagnosis of pertussis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(4):1005-26. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>
8. Leber AL, Salamon DP, Prince HE. Pertussis diagnosis in the 21st Century: Progress and pitfalls, Part II. Clin Microbiol Newslett. 2011;33:119-26. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.07.005>
9. Matthews RC, Golbang N, Bruck WM, et al. Semiquantitative polymerase chain reaction enzyme immunoassay for the diagnosis of pertussis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18(10):748-50. <https://doi.org/10.1007/s100960050392>
10. U.S. Food and Drug Administration. Statistical guidance on reporting results from studies evaluating diagnostic tests - guidance for industry and FDA staff. [<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/statistical-guidance-reporting-results-studies-evaluating-diagnostic-tests-guidance-industry-and-fda>] (Erişim tarihi: Haziran 2022).
11. Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 8):749-54. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45585-0>
12. Templeton KE, Scheltinga SA, van der Zee A, et al. Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. J Clin Microbiol. 2003;41(9):4121-6. Erratum in: J Clin Microbiol. 2004;42(4):1860. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4121-4126.2003>
13. Tilley PA, Kanchana MV, Knight I, Blondeau J, Antonishyn N, Deneer H. Detection of *Bordetella pertussis* in a clinical laboratory by culture, polymerase chain reaction, and direct fluorescent antibody staining; accuracy, and cost. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;37(1):17-23. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00117-6](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00117-6)
14. Sloan LM, Hopkins MK, Mitchell PS, et al. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. J Clin Microbiol. 2002;40(1):96-100. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.96-100.2002>

15. Chow SK, Arbefeville S, Boyanton BL Jr, et al. Multicenter performance evaluation of the Simplexa Bordetella Direct Kit in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2020;59(1):e01041-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01041-20>
16. Kenicer J, Hardie A, Hamilton F, Gadsby N, Templeton K. Comparative evaluation of the Diagenode multiplex PCR assay on the BD max system versus a routine in-house assay for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2668-70. <https://doi.org/10.1128/JCM.00212-14>
17. Karagul A, Ogunc D, Midilli K, et al. Epidemiology of pertussis in adolescents and adults in Turkey. *Epidemiol Infect.* 2015;143(12):2613-8. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003483>
18. Tatti KM, Wu KH, Tondella ML, et al. Development and evaluation of dual-target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(3):264-72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.017>
19. Özbek ÖA, Öktem İMA, Hekimoğlu CH, et al. Hücre içermeyen boğmaca aşısı uygulamasının altıncı yılında Türkiye'nin Manisa ilindeki pertussis toksin antikor seroprevalansı. *Mikrobiyol Bul.* 2018;52(2):180-9. <https://doi.org/10.5578/mb.57534>
20. Öksüz L, Hançerli S, Somer A, Salman N, Gürler N. Pertussis in children in the İstanbul Faculty of Medicine: results for four years. *Turk J Pediatr.* 2014;56(6):632-7.
21. Tamburacı Uslu ZD, Ceyhan M, Dinleyici EÇ, et al. Detection of the presence of *Bordetella pertussis* by real-time polymerase chain reaction in children diagnosed with pertussis and among their household contacts. *J Vaccines Vaccin.* 2013;4;6 <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000199>
22. Gökçe Ş, Kurugöl Z, Aydemir Ş, Çiçek C, Aslan A, Koturoğlu G. *Bordetella pertussis* infection in hospitalized infants with acute bronchiolitis. *Indian J Pediatr.* 2018;85(3):189-93. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2480-4>