

# BOĞMACA HASTALIĞININ LABORATUVAR TANISINDA KÜLTÜR VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

## THE EVALUATION OF CULTURE AND POLYMERASE CHAIN REACTION IN LABORATORY DIAGNOSIS OF PERTUSSIS

Selin NAR ÖTGÜN<sup>1</sup>, Emek TÜRKEKUL ŞEN<sup>2</sup>, Orhan ŞAYLI<sup>3</sup>, Berrin ESEN<sup>2</sup>, Rıza DURMAZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı,

<sup>2</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

<sup>3</sup>Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı

<sup>4</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

### ÖZ

**AMAÇ:** Boğmaca her yaştaki duyarlı bireyi etkileyebilen, *Bordetella pertussis*'in neden olduğu akut bir solunum sistemi enfeksiyonudur. Laboratuvar tanıda altın standart olan kültür yönteminin özgüllüğünün çok yüksek olduğu ancak duyarlılığının çeşitli faktörlerden etkilendiği ve uzun sürede sonuçlandığı bilinmektedir. Bu nedenle boğmacanın laboratuvar tanısında daha hızlı sonuç veren moleküler tabanlı yöntemlerin uygulanması her geçen gün daha önem kazanmaktadır. Söz konusu gelişmeler ışığında bu çalışmada boğmaca hastalığının laboratuvar tanısında kültür, laboratuvar yapımı konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve ticari kökenli gerçek zamanlı PZR (Light Cyler) yöntemlerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmaya Mayıs 2011 ile Kasım 2011 tarihleri arasında Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'na gelen 240 olası boğmaca vakasına ait nazofarinks sürüntü örnekleri dahil edildi. Klinik örnek alınması ve laboratuvara ulaştırılması için Halk Sağlığı Müdürlüklerine daha önceden Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı tarafından gönderilen, Dacron uçlu, esnek gövdeli, steril eküvyon çubukları ile kömürlü Amies transport besiyerleri (Transwab Pernasal, MW173C, Medical Wire & Equip. Co. Ltd, UK) kullanıldı. Laboratuvara gelen klinik örneklerde Boğmaca hastalığı etkeni *Bordetella pertussis*'in varlığı; kültür, laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR ve ticari kökenli gerçek zamanlı PZR (Light Cyler, Roche, Germany) yöntemi ile incelendi.

**BULGULAR:** Klinik örneklerin 18'inin (%7.5) kültüründe *B. pertussis* üredi. Laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR yöntemiyle 240 örneğin 59'unda (%24.6), ticari kökenli gerçek zamanlı PZR (Light Cyler) yöntemiyle 89 örnekte (%37) spesifik gen bölgeleri saptandı. Kültürde üreme olmayan örneklerin 43'ünde (%17.9) konvansiyonel PZR ile, 71'inde ise (%29.6) "Light Cyler" PZR ile *B. pertussis* genlerinin varlığı gösterildi.

**SONUÇ:** Özellikle klinik örnek alınmadan önce spesifik antibiyotik tedavisi uygulanan vakalar ile *B. pertussis*'in uygunsuz transport koşulları nedeniyle canlılığını kaybettiği durumlarda PZR yöntemlerinin ön plana çıktığı gözlemlendi. Sonuç olarak boğmacanın laboratuvar doğrulamasında kültür yönteminin PZR yöntemi ile birlikte uygulanması ve elde edilen bulguların hastanın epidemiyolojik ve klinik özellikleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varıldı.

**ANAHTAR KELİMELER:** Boğmaca, laboratuvar tanı, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu

**Geliş Tarihi / Received:** 27.02.2019

**Kabul Tarihi / Accepted:** 26.03.2019

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Dr.Öğr.Üyesi Emek TÜRKEKUL ŞEN  
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**E-mail:** emek276@hotmail.com

**Orcid No:** 0000-0002-4328-7190

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Pertussis is an acute respiratory tract infection caused by *Bordetella pertussis* that can affect a susceptible individual of all ages. It is known that the specificity of culture method, which is the gold standard in laboratory diagnosis, is very high but its sensitivity is affected by various factors and it results in a long time. Therefore, the application of molecular-based methods, which give rapid results in the laboratory diagnosis of pertussis, is becoming more and more important. In the light of these developments, the aim of this study was to evaluate the culture, laboratory-made conventional polymerase chain reaction (PCR) and commercial real-time PCR (Light Cyler) methods for laboratory diagnosis of pertussis.

**MATERIAL AND METHODS:** A total of 240 nasopharyngeal swab specimens from probable pertussis cases were included in the study from May 2011 to November 2011 in National Reference Laboratory for Respiratory Pathogens. Dacron tipped, flexible body, sterile swabs and charcoal Amies transport media (Transwab Pernasal, MW173C, Medical Wire & Equip. Co. Ltd, UK) were used for clinical sampling and delivery to the laboratory. The presence of *Bordetella pertussis* in clinical samples was investigated by culture, laboratory made conventional PCR and commercial real-time PCR (Light Cyler, Roche, Germany) method.

**RESULTS:** *B. pertussis* was recovered in 18 (7.5%) of the clinical specimens by culture. Specific gene segments were detected in 59 (24.6%) of 240 samples by laboratory-made conventional PCR method, and 89 (37%) by the commercial real-time PCR (Light Cyler) method. The presence of *B. pertussis* genes was shown in culture negative clinical specimens by conventional PCR in 43 samples (17.9%) and Light Cyler PCR in 71 samples (%29.6).

**CONCLUSIONS:** PCR methods were observed to yield consistent results especially in cases where specific antibiotic treatment was applied before the clinical sample was taken, and in cases where *B. pertussis* lost its viability in the specimens, due to inappropriate transport conditions. In conclusion, it was concluded that the culture method should be applied together with PCR method and the findings should be evaluated together with epidemiological and clinical features of the patient.

**KEYWORDS:** Pertussis, laboratory diagnosis, culture, polymerase chain reaction

## GİRİŞ

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in neden olduğu her yaş grubundaki duyarlı bireyleri etkileyebilen, özellikle bebeklik döneminde ağır seyreden, akut bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonudur. Dünyada her yıl 20 milyon boğmaca vakasının gözleendiği ve çoğu küçük çocuklar olmak üzere yaklaşık 200.000 ölüme neden olduğu bilinmektedir. Görülme sıklığı, aşı ve antibiyotik öncesi dönemlere göre azalmış olsa da boğmaca halen tüm dünyada endemik olarak gözlenmekte ve her 3-5 yılda bir epidemilere yol açmaktadır (1,2).

Boğmaca ülkemizde Genişletilmiş Bağışıklama Programı kapsamında izlenen bildirimi zorunlu hastalıklardan bir tanesidir (3-5). *B. pertussis* klasik mikrobiyoloji eğitiminin iyi bilinen mikroorganizmalarından biri olmasına rağmen ülkemizde az sayıda klinik laboratuvarın *B. pertussis* tanısı koyabiliyor olması dikkat çekicidir. 2012 yılında ülke genelinde laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, çalışmaya katılan 510 klinik mikrobiyoloji laboratuvarının sadece %2.1'i boğmaca tanısı koyabilmektedir (6). Tanının sahada yaygın bir eğilimle klinikte karakteristik öykü ve fizik muayene bulgularına dayalı konuyor olması laboratuvar tanı kapasitesini sınırlayan faktörlerden biri gibi gözükmektedir. Çünkü çoğu laboratuvar boğmaca tanısı için gereken kaynağı (iş gücü, maddi vb.) yetersiz örnek akışı olasılığı yüzünden verimli kullanamayacağını varsayarak ayırmamaktadır. Ancak etkili bir eliminasyon ya da kontrol programı için laboratuvara dayalı tanı esastır (7).

Boğmaca tanısında kültür yöntemi altın standarttır ancak duyarlılığı hastalığın evresi, hastanın yaşı, aşı durumu, örnek alımında kullanılan ekipman, doğru örnek alım yönteminin uygulanması, ekim için kullanılan spesifik besiyerlerinin kalitesi, inkübasyon koşulları ve laboratuvarın deneyimi ile yakından ilişkilidir (7, 8).

Boğmaca şüpheli olgulardan alınan klinik örneklerde konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) veya gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile patojen bakterinin saatler içerisinde saptanabildiği bilinmektedir (9-13).

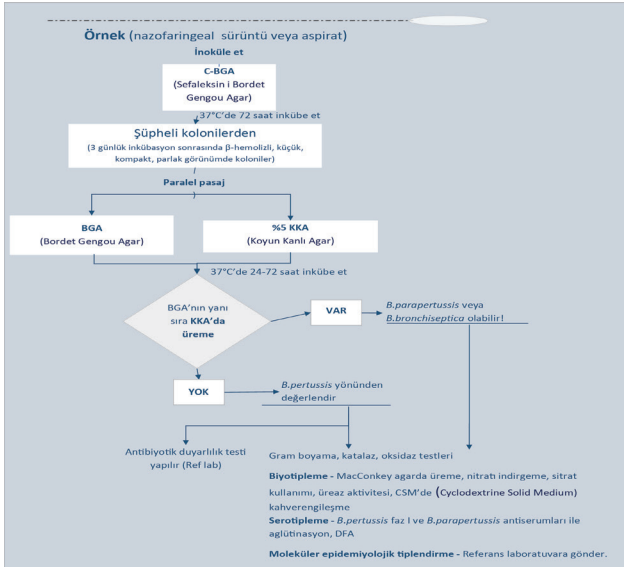
Gerek kültür yöntemine ilişkin özellikler, gerek *B. pertussis*'e spesifik gen bölgelerini hedefleyen DNA amplifikasyonu tabanlı ticari ürünlerin olmayışı, gerekse mevcut moleküler tanı kitlerinin yüksek maliyetli oluşu nedeniyle ülkemizde kısıtlı sayıda merkezde boğmaca tanı testleri uygulanmaktadır (6, 7).

Bu çalışmada amacımız boğmaca hastalığının laboratuvar tanısında kültür, laboratuvar yapımı konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu ve "Light Cycler" polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin değerlendirilmesidir. Aynı zamanda çalışmamızla ülkemizde boğmaca hastalık kontrol programına güncel ve geçerli yöntemleri kullanarak doğru, güvenilir ve zamanında veri sunulması, bu sayede ulusal verilerimizin oluşturulmasına destek olunması da mümkün olacaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Mayıs 2011 ile Kasım 2011 tarihleri arasında olası boğmaca olgularından alınan ve incelenmek üzere Ulusal Boğmaca Referans Laboratuvarı'na gönderilen 240 nazofarinks sürüntü örneği (NFS) dahil edildi. Klinik örnek alınması ve laboratuvara ulaştırılması için Halk Sağlığı Müdürlüklerine daha önceden kurumumuzca gönderilen Dacron uçlu, esnek gövdeli, steril eküvyon çubukları ile kömürlü Amies transport besiyerleri (Transwab Pernal, MW173C, Medical Wire & Equip. Co. Ltd, UK) kullanıldı. Her bir hastanın epidemiyolojik ve klinik bilgilerini içeren vaka bilgi formu da örnekle birlikte laboratuvarımıza gönderildi. NFS örnekleri; %20 at kanı ve 10mg/L sefalekssin (Wako, Japan) içeren Bordet Gengou Agar (C-BGA) besiyerine (Becton, Dickinson and Company, United States) ekildi. Plaklar 36°C'de, yüksek nemli ortamda inkübe edildi ve 48. saatten itibaren kuşku lu kolonilerin varlığı açısından değerlendirildi. Üreme gözlenmeyen plakların inkübasyonu yedinci günün sonuna kadar uzatıldı. Üreme gözlenen plaklar koloni morfolojisi yönünden stereomikroskop altında incelendi. *Bordetella sp* ile uyumlu görünümde olan (klasik olarak düzgün kenarlı, düz yüzeyle, yaklaşık 1 mm çapında, transparan, konveks) koloniler incelemeye alındı. Kuşku lu kolonilerin Gram morfolojik

yapısı, oksidaz, üre hidrolizi, koyun kanlı agarda üreme ve *B. pertussis* faz I antiserum (Becton, Dickinson and Company, United States) ile aglütinasyon özellikleri incelendi. Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarında nazofarinks örnekleri kültüründen *B. pertussis* izolasyonu ve tanımlanması için uygulanan akış şeması belirtildi (7)(Şekil 1).



**Şekil 1:** Nazofarinks örneklerinden *B. pertussis* izolasyonu ve tanımlanması için akış şeması

NFS örnekleri, ekim yapıldıktan sonra 500 mikrolitre fosfatlanmış tamponlu tuzlu su (PBS) içinde süspansiyon edilip -86°C'de stoklandı. Klinik örnek süspansiyonlarından genomik DNA ekstraksiyonu High Pure PCR Template Preparation Kiti (Roche, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. "Light Cycler" PZR yöntemi; LightCycler Fast Start DNA Master hibridizasyon problrarı (Roche, Germany) ve LightMix Kit *Bordetella pertussis* & *parapertussis* (TIB MOLBIOL, Germany) kullanılarak LightCycler 480 II cihazında (Roche, Germany) üretici firmaların önerilerine göre yapıldı. *B. pertussis* için IS481, *B. parapertussis* için IS1001 gen bölgelerinin hedeflendiği kantitatif multipleks PZR yöntemi uygulandı. Kitin prospektüsünde; yöntemin 10 kopya *B. pertussis*/*B. parapertussis* DNA'sını saptayabilecek duyarlılığa sahip olduğu belirtilmektedir (15).

Laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR'da *B. pertussis*'in pertussis toksin promoter (ptxA-Pr) gen bölgesinin (191 bp) amplifikasyonu için PTP1 ve PTP2 primer çifti kullanıldı (14). Test, 50 mikrolitre reaksiyon karışımında (5 µl 10XPCR buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.26 pmol/µl

primer ve 1.3 U polimeraz (5 U/µl, MBI Ferman-tas); 4 µl kalıp DNA bulunacak şekilde "in-house" olarak hazırlandı. Amplifikasyon; 95°C'de 5 dakikalık ilk denatürasyonu takiben, 94°C'de 45 sn denatürasyon, 57°C'de 45 sn bağlanma ve 72°C'de 45 sn uzama adımlarından oluşan 35 siklus ve 10 dk 72°C'de son uzama olacak şekilde (Touchgene Techne, İngiltere) gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromür eklenmiş %2.5'lik agaroz jel (3:1 Nusieve agarose; FMC BioProducts, ABD; BioRad, İtalya) kullanılarak görüntülendi. Laboratuvarımızda yöntemin geçerli kılınması aşamasında daha önce yaptığımız çalışmalarda temsili nitelikteki klinik örneklerde PTP1/PTP2 primerleri ile en düşük saptanan sınır değeri 6.9 x 10<sup>2</sup> cfu/ml olarak bulunmuştu (14).

Laboratuvar çalışmalarında yöntemlerin kalite güvencesinin sağlanması amacıyla kontrol suşları olarak *B. pertussis* Tohama I, *B. pertussis* ATCC 9797, Bordetella parapertussis ATCC 15311, Bordetella bronchiseptica ATCC 4617 kullanıldı (7).

*B. pertussis* Risk Grubu 2 mikroorganizmalardan bir tanesi olduğu için boğmaca şüpheli klinik örneklerle ilgili laboratuvar incelemelerin tamamı Biyogüvenlik Düzeyi 2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirildi (7).

## BULGULAR

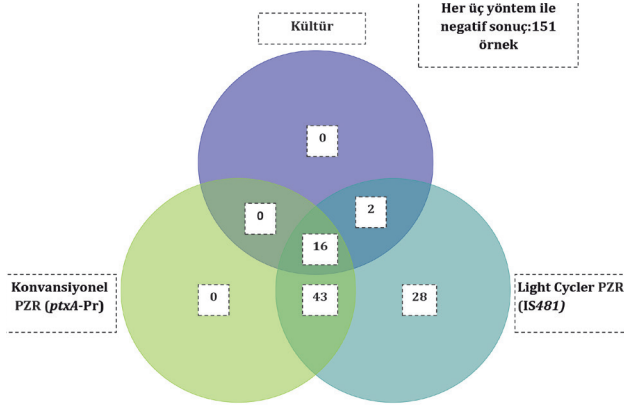
Olası boğmaca vaka tanımına uyan 240 hastanın %49.2'si erkek, %50.8'i kadındı. Olguların yaş gruplarına ve aşı öykülerine göre dağılımı belirtildi (Tablo 1).

**Tablo 1:** Olası boğmaca vakalarının yaş gruplarına ve aşı öykülerine göre dağılımı

Yaş grubu	Hasta sayısı (n)	Aşılı			Boğmaca Aşı Öyküsü		Bilinmiyor/Belirtilmemiş
		<3 doz	=3 doz	>3 doz	Aşısız	Dozu bilinmiyor	
<2 ay	61	0	0	0	61	0	
2-6 ay	119	36	4	0	38	34	
7-23 ay	19	1	1	1	4	8	
2-6 yaş	8	0	0	0	1	4	
7-11 yaş	8	0	0	0	0	5	
≥12 yaş	18	0	1	0	8	9	
Belirtilmemiş	7	0	0	0	1	3	
Toplam (n)	240	37	6	1	28	105	
(%)	100	15,4	2,5	0,4	11,7	43,8	26,2

Olguların 72'si (% 30) boğmacaya karşı aşılı, 105'i (%43.8) aşısız olmakla birlikte, 63'ünün (%26.2) aşı öyküsü bilinmemekteydi. NFS örnekleri spesifik kültür, laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR ve ticari kökenli "Light Cycler" PZR yöntemleriyle incelendi. Örneklerin 18'inin (%7.5) kültüründe *B. pertussis* üredi. Laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR yöntemiyle 240 örneğin

59'unda (%24.6), "Light Cycler" PZR yöntemiyle 89 örnekte (%37) spesifik gen bölgeleri saptandı. Kültürde üreme olmayan örneklerin 43'ünde (%17.9) laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR ile, 71'inde ise (%29.6) "Light Cycler" PZR ile *B. pertussis* genlerinin varlığı gösterildi. Kültür, laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR ve "Light Cycler" PZR ile elde edilen sonuçlar arasındaki ilişki **Şekil 2**'de belirtildi.



**Şekil 2:** Kültür, konvansiyonel PZR (ptxA-Pr) ve Light Cycler PZR (IS481) yöntemleri ile elde edilen pozitif sonuçlarının ilişkisi

Kültüründe *B. pertussis* saptanan 18 vakanın 16'sı bir yaşından küçük bebek olup sadece 6'sı boğmacaya karşı aşılama başlanmış ancak primer immünizasyonları henüz tamamlanmamıştı. PZR'da pozitiflik saptanan olguların 31'i 2 aydan küçük bebekler iken 45'i 2-6 aylık bebeklerdi. Kültür ve/veya PZR ile tespit edilen vakaların klinik tabloları boğmacaya ile uyumluydu. Olguların 82'sinde öksürük nöbetleri, 44'ünde "öksürük nöbetleri ve iç çekmeli solunum", 32'sinde "öksürük nöbetleri ve öksürük sonrası kusma", 18'inde "öksürük nöbetleri, iç çekmeli solunum ve öksürük sonrası kusma" mevcuttu.

Dacron uçlu eküvyonla alınan ve kömürlü Amies transport besiyerinde laboratuvara gönderilen örneklerle ait laboratuvar kayıtları incelendiğinde; sadece PZR ile pozitiflik saptanan 71 örneğin yalnızca 5'inin aynı gün içinde, 25'inin alındıktan bir gün sonra, yedisinin iki gün sonra, 34'ünün ise 3 gün ve sonrasında laboratuvara ulaştırılmış olduğu dikkati çekti. Kültürde üremediği halde PZR ile bakteriye spesifik gen bölgeleri saptanan vakaların 28'ine, örnek almadan önce spesifik antimikrobiyal tedavi başlandığı, 32'si için tedavi uygulanıp uygulanmadığına yönelik herhangi bir bilgi olmadığı tespit edildi.

Kısaca özetlemek gerekirse; kültürde üremeyip PZR ile pozitiflik saptanan olguların ortak özellikleri arasında örneklerin 24 saatten daha uzun sürede laboratuvara ulaştırılması ve olgulara örnek almadan önce antibiyotik tedavisi başlanmış olması yer almaktaydı.

## TARTIŞMA

Boğmaca, aşı ile önlenilebilir hastalıklar içerisinde en az kontrol edilebilen hastalık olarak bilinmektedir. Boğmacanın görülme sıklığı, aşı ve antibiyotik öncesi dönemlere göre azalmış olsa da, halen her 2-5 yılda bir epidemilere yol açmaktadır. Bu noktada rutin aşılanmanın yaşam boyu koruyuculuk sağlayamaması ve bu nedenle ergen ve erişkinlerden oluşan duyarlı bir grubun ortaya çıkışı önemlidir. Bununla birlikte anneden bebeğe transplental yolla geçen spesifik antikorların yeterli düzeyde olmayışı nedeniyle de özellikle yaşamın ilk iki ayında boğmaca enfeksiyonuna oldukça duyarlı bir grup oluşmakta; bu vakalara doğru, güvenilir ve zamanında tanı konmadığında hastalığın morbidite ve mortalitesi oldukça artmaktadır (1, 2, 16, 17).

Boğmaca tanısının hızla konmasının hastalığın tedavisine yön vermede ve sekonder bulaşın önlenmesinde son derece önemli olduğu bilinmektedir. Özellikle spesifik antibiyotik tedavisi uygulanmış, aşıllı, kataral ve erken paroksizmal evreleri geçirmiş vakaların tanısında, klinik örnekteki etken bakterinin uygunsuz transport koşulları nedeniyle canlılığını kaybedebildiği durumlarda duyarlılığı kültürden daha yüksek ve bakterinin genomik yapılarını tespit edebilen yöntemler ön plana çıkmaktadır (1, 2, 8,9,16).

*B. pertussis* tanısında IS481 gen bölgesini hedef alan PZR yöntemi oldukça duyarlıdır; ancak bu dizi *B. bronchiseptica* ve *B. holmesii* türleri ile yüksek homoloji gösterdiği için çapraz reaksiyonlarla karşılaşmaktadır. ptxA-Pr gen bölgesi hedeflendiğinde ise özgüllük oldukça yüksek olmakla birlikte; duyarlılık, IS481'i hedef alan PZR yönteminden daha düşüktür. Bu nedenle tanının, genellikle IS481'i hedef alan PZR ile konması, ve ptxA-Pr'yi hedef alan PZR ile konfirmasyon yapılması önerilmektedir (8-14). Boğmaca tanısında nükleik asit amplifikasyon testlerinin kullanımı ile ilgili "Pertussis Consensus

Group" tarafından 2005 yılında yayınlanan önerilerde ise; toplumda solunum yolu enfeksiyonlarında *B. bronchiseptica* ve *B.holmesii* insidansı çok düşük olduğundan, hastanın semptomları uyumlu ise, rutinde klinik örnekteki IS481 PZR pozitifliğinin *B. pertussis* enfeksiyonu olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir (11). Bizim çalışmamızda da boğmaca hastalığı etkeni *B. pertussis*'in araştırılmasında kültürün yanı sıra ptxA-Pr'yi hedefleyen laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR ile IS481'i hedef alan ticari kökenli "Light Cyler" PZR yöntemi kullanıldı. İncelemeye alınan 240 NFS örneğinin %7.5'unda *B. pertussis* üredi. Kültürde üremeyen örneklerin %17.9'unda ptxA-Pr, %29.6'sında ise IS481 gen bölgelerinin varlığı gösterildi.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada uzamış öksürüğü olan 51 hastadan birinin kültüründe *B. pertussis* üremiş; 6 (%11.8) hastanın örneğinde ise IS481'i hedef alan gerçek zamanlı PZR ile pozitiflik saptanmıştır (18). Türkiye'de 35 çocuk hastanın dahil edildiği bir başka çalışmada kültürde herhangi bir üreme yok iken PZR ile vakaların %5.7'sinde pozitiflik tespit edilmiştir (19). Dünyada yapılan çeşitli çalışmalarda; moleküler tabanlı yöntemlerde farklı gen bölgeleri hedeflenmiş ve farklı metodolojiler uygulanmıştır. Bu kapsamda PZR ile saptanan pozitiflik oranları %12.8 ile %40'lar arasında değişim göstermektedir (20-23).

*B. pertussis*'in kültürlerden başarılı bir şekilde izolasyonunun; klinik örneklerin uygun bir şekilde alınması ve uygun şartlarda laboratuvara iletilmesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada; silyalı epitele afinitesi olduğu bilinen *B. pertussis*'e ulaşmak için NFS örnekleri alınmıştır. Örnekler, hem kültür hem PZR çalışmaları için uygun uçlu eküvyon çubukları ile alınmış ve kömürlü Amies transport besiyerinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Ancak transport süresinin bazı durumlarda uzun olması nedeniyle bakterinin canlılığını yitirdiği ve bu nedenle kültürde üremenin negatif yönde etkilendiği düşünülmektedir (7-9). Bizim bulgularımız da bunu destekler niteliktedir. Antibiyotik tedavisi başlanmadan önce nazofaringeal sürüntü örneği alınması da kültürün başarısını etkileyen faktörlerden bir tanesidir.

Kültürde üreme gözlenmediği halde PZR ile bakteriye ait gen bölgeleri saptanan örneklerin 28'inin spesifik antimikrobiyal tedavi başlandıktan sonra alındığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak özellikle spesifik antibiyotik tedavisi başlandıktan sonra klinik örnek alınan vakalar ile *B. pertussis*'in uygunsuz transport koşulları nedeniyle canlılığını kaybettiği durumlarda PZR yöntemlerinin önem kazandığı gözlenmiştir. Bu çalışmada uyguladığımız laboratuvar yapımı konvansiyonel PZR yöntemi *B. pertussis*'e spesifik genomik bölgeleri tespit etmekle birlikte klinik örnekteki en düşük saptama limiti  $6.9 \times 10^2$  düzeyindedir. Öte yandan ticari kökenli gerçek zamanlı PZR (Light Cyler) yöntemiyle saptanan en düşük bakteri konsantrasyonunun 100 cfu/ml'nin altında olması ve *B. parapertussis*'e özgül IS1001 gen bölgesinin varlığının tespit edilebilmesi kayda değer avantajlar olarak dikkat çekmektedir. Ancak boğmaca tanısı için ticari kökenli gerçek zamanlı PZR (Light Cyler) yönteminde kullanılan IS481 gen bölgesinin diğer Bordetella türlerinde de var olduğu bilinmektedir. İşte bu noktada boğmacaya neden olan *B. pertussis* ve boğmaca benzeri hastalık yapan *B. parapertussis*, *B.holmesii* ve *B. bronchiseptica* gibi diğer Bordetella türlerinin tanımlanabilmesi için türlere özgül gen bölgelerinin hedeflendiği gerçek zamanlı, DNA amplifikasyon temelli yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu gözlenmiştir. Ülkemizde boğmaca hastalık kontrol programına doğru, güvenilir, zamanında veri sunulabilmesi amacıyla Ulusal Referans Laboratuvarı tarafından yürütülen çalışmaların önemli olduğu, şu an için kültür yönteminin PZR yöntemleri ile birlikte uygulanması ve elde edilen sonucun hastanın epidemiyolojik ve klinik özellikleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record 2015;35(90): 433-460. <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1> (son erişim tarihi: 12.12.2018).
2. Cherry JD. Epidemic Pertussis in 2012-Resurgence of a Vaccine-Preventable Disease. New England J Medicine 2012;30:785-787.

3. Genişletilmiş Bağışıklama Programı Genelgesi, Sağlık Bakanlığı, Ankara-2009. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-8187/genisletilmis-bagisiklama-programi-genelgesi-2009.html> (son erişim tarihi: 12.12.2018).
4. Boğmaca Saha Rehberi. Sağlık Bakanlığı, Ankara-2003.
5. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 12.12.2018).
6. T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - Lab-Kap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
7. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı, B-MT-01. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, ISBN: 978-975-590-489-4, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, 2014, Ankara.
8. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. Geneva, World Health Organization, Update 2014 (WHO/IPV/14.03). [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO\\_IVB\\_14.03\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf).
9. Van der Zee A, Schellekens JFP, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Mic Rev* 2015; 28(4): 1005-1026.
10. Guidance and protocol for the use of real-time PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. ECDC, 2012, Stockholm, Sweden. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Guidance-protocol-PCR-laboratory-diagnosis-bordetella-pertussis-parapertussis.pdf>.
11. Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 4925-9.
12. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 2012;50:2186–2190. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00612-12>.
13. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, Crowcroft N, Miller E, George RC, Harrison TG. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years’ experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58, 1023–1029.
14. Güldemir D, Akbaş E, Nar Ötgün S, Tekin A, Esen B. Boğmacanın Moleküler Tanısı İçin Laboratuvar Yapımı Bir PCR Yönteminin Geliştirilmesi ve Optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 632-645.
15. Kösters K, Resichl u, Schmetz J, Riffelman M, Wirsing von König CH. Real time LightCycler PRC for Detection and Discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1719-22. <http://dx.doi.org/10.1128/JMC.40.5.1719-1722.2002>.
16. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book, Pertussis, 13th Edition, CDC, 2015. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf>.
17. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation—two sides of the same coin. *Epidemiol Infect* 2014;142:685–694.
18. Gürsel D, Aslan A, Sönmez C, Koturoğlu G, Çöplü N, Kurugöl Z, Aydemir Ş. Uzamış Öksürüğü Olan Çocuklarda Kültür, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Seroloji ile *Bordetella pertussis* Enfeksiyonunun Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2): 211-224.
19. Cengiz AB, Yildirim I, Ceyhan M, Seçmeer G, Gür D, Kara A. Comparison of nasopharyngeal culture, polymerase chain reaction (PCR) and serological test for diagnosis of pertussis. *Turk J Pediatr* 2009; 51(4):309-16.
20. Fry NK, Tzivra O, Li YT, McNiff A, Doshi N, Maple PA, Crowcroft NS, Miller E, George RC, Harrison TG. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology. *J Med Microbiol* 2004; 53: 519–525.
21. 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; 53:749–754. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45585-0>.
22. Nikbin VS , Shahcheraghi F, Lotfi MN , Zahraei SM , Parzadeh M. Comparison of culture and real-time PCR for detection of *Bordetella pertussis* isolated from patients in Iran. *Iranian J Microbiol* 2013; 5(3):209-214.
23. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2872–2876.