

Viral Solunum Yolu Enfeksiyonlarının Tanısında Bir Multipleks PCR Yönteminin Performansının Değerlendirilmesi§

Ayşe ARSLAN*, Candan ÇİÇEK*, Eylem Ulaş SAZ**, Figen GÜLEN**, Haydar SOYDANER KARAKUŞ***

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

***Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: Çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle ["shell vial" hücre kültürü yöntemi, direkt floresans antikor (DFA)] multipleks polimerize zincir tepkimesi (PCR) test yöntemi- ni karşılaştırmak ve multipleks PCR testinin performansını değerlendirmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu tanılı 502 [217 (%43.2) kadın, 285 (%56.8) erkek] nazofarengeal sürüntü örneği incelendi. Solunum virüslerinin saptanmasında, DFA ve "shell vial" hücre kültürü yöntemi altın standart olarak alındı. Multipleks PCR testi için, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Bulgular: Değerlendirilen hastaların 238'inde (%47.4) en az bir yöntemle solunum virüsleri pozitif bulundu. İncelenen 502 örneğin 189'u (%37.6) DFA ve shell vial hücre kültürü yöntemi ile pozitif [human metapneumovirus (HMPV), human coronavirus (HCoV), human rhinovirus (HRV), human bocavirus (HBoV) ve parainfluenza virüs tip 4 (PIV 4) hariç], 233'ü (%46.4) multipleks PCR ile pozitif bulundu. Yalnızca HMPV, HCoV, HRV, HBoV ve PIV 4'ün pozitif olduğu 37 örnek, DFA ve shell vial hücre kültürü ile saptanamadığı için karşılaştırma dışı bırakıldı. Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve test geçerlilik oranları sırasıyla %97.3, %95.7, %93.9, %98.1 ve %96.3 olarak bulundu.

Sonuç: Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda sırasıyla en sık saptanan solunum virüsleri respiratory sinsitial virüs (RSV), HRV ve influenza virüs tip A (INF A) olmuştur. Multipleks PCR'in duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek bulunmuştur. Multipleks PCR'in DFA ve hücre kültürü yöntemleriyle saptanamayan 37 solunum virüsünü de tanımlayabildiği görülmüştür. Multipleks PCR'in yüksek duyarlılık ve özgüllüğe nedeniyle rutin laboratuvar kullanımına uygun olduğu öngörülmüştür.

Anahtar kelimeler: Multipleks PCR, solunum virüsleri, solunum yolu enfeksiyonu

ABSTRACT

Evaluation of the Performance of a Multiplex PCR Method for the Diagnosis of Viral Respiratory Tract Infections

Objective: In this study, we aimed to compare multiplex PCR (mPCR) assay with conventional methods [direct fluorescent antibody (DFA) test and shell vial cell culture] for the detection of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infection and to evaluate the performance of the multiplex PCR method.

Materials and Methods: Between January 2012 and August 2013, nasopharyngeal swab specimens collected from 502 [43.2% female, 285 (56.8% male)] patients with acute respiratory tract infection were analyzed. Shell vial cell culture and DFA were used as a gold standard method for the detection of respiratory viruses. Multiplex PCR test was performed according to the manufacturer's instructions.

Results: Two hundred and thirty-eight (47.4%) patients were positive for respiratory viruses as detected by at least one method. Among 502 specimens analyzed, 189 (37.6%) were positive using the combination of DFA and shell vial cell culture [excluding human metapneumovirus (HMPV), human coronavirus (HCoV), human rhinovirus (HRV), human bocavirus (HBoV), parainfluenza virus type 4 (PIV 4)], and 233 (46.4%) were positive by mPCR. Thirty-seven samples were excluded from the comparison, because HMPV, HCoV, HRV, HBoV, PIV 4 could not be detected by DFA and shell vial cell culture. The overall sensitivity, specificity, positive, and negative predictive value, and diagnostic accuracy of mPCR were 97.3, 95.7, 93.9, 98.1 and 96.3%, respectively.

Conclusion: Respiratory syncytial virus (RSV), HRV and influenza virus type A (INF A) were the most frequently identified respiratory viruses in patients with respiratory tract infections. The sensitivity and specificity of mPCR were found to be quite high. Additionally mPCR could identify 37 respiratory viruses that DFA and cell culture could not. As the mPCR method was found to have high sensitivity and specificity, it was predicted to be suitable for use in routine laboratories.

Keywords: Multiplex PCR, respiratory viruses, respiratory tract infections

Alındığı tarih: 16.06.2015

Kabul tarihi: 19.12.2016

Yazışma adresi: Ayşe Arslan, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Tel: (0232) 390 30 20

e-posta: aysa_demir@hotmail.com

§ Bu çalışma II. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi'nde (9-13 Kasım 2013, Antalya) poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Akut solunum yolu enfeksiyonu insanlarda en sık görülen hastalıklardan biridir. Erişkinlerde özellikle bağışık yetmezlikli hastalarda ve çocuklarda önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre tüm yaş grupları incelendiğinde solunum sistemi hastalıkları en sık ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada (%9.67) yer alırken, hastaneye yatış nedenleri arasında ilk sırada (%12.8) yer almaktadır⁽¹⁾. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2012 yılı raporuna göre 5 yaş altı çocuklarda en sık ölüm nedenleri arasında beşinci sırada (%8) yer alır⁽²⁾.

Akut solunum yolu enfeksiyonlarının en sık nedeni virüslerdir. Yaklaşık olarak 20'den fazla virüs türünün akut solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu virüslerden en sık karşılaşılan; respiratuar sinsityal virüs(RSV), adenovirus (ADV), influenza virüs tip A ve B (INF A/B), parainfluenza virüs tip 1-3 (PIV 1-3), human rhinovirus A/B (HRV A/B), enterovirus (EV), human coronavirus (HCoV) gibi klasik solunum virüslerine yeni solunum virüsleri olan human bocavirus (HBoV), human metapneumovirus (HMPV) de eklenmiştir⁽³⁾. Gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek, gerekli antiviral ilacı kullanabilmek, nozokomiyal bulaş riskini en aza indirmek, hastalığın yayılımı ve engellenmesi konusunda erken bilgi vermek ve hasta yönetiminde gereksiz mali kaybı önlemek için solunum yolu enfeksiyonlarının etiyolojik tanısını koymak çok önemlidir⁽⁴⁾. Bu yüzden viral solunum yolu enfeksiyonlarının hızlı, duyarlı ve geçerli bir yöntemle kısa sürede tanımlanması gerekir.

Son dekatta, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan solunum virüslerinin hepsini tek bir örnekte ve tek bir test ile aynı anda tespit edebilen nükleik asit saptama prensibine dayanan çok sayıda multipleks PCR yöntemi geliştirilmiştir.

PCR yönteminin klasik yöntemler olan hücre kültürü ve direkt floresan antikor testi (DFA)'nden daha kısa sürede sonuç verdiği ve daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bazı yeni solunum virüsleri yalnızca PCR yöntemi ile saptanmakta, hücre kültürü yöntemi ve DFA ile saptanamamaktadır⁽⁴⁾.

Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle (shell vial hücre kültürü yöntemi ve DFA) multipleks PCR test yöntemi karşılaştırmak ve multipleks PCR testinin performansını değerlendirmek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2012-Ağustos 2013 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'na solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile gönderilen 502 nazofarengeyal sürüntü örneği incelendi. Örnekler arşiv materyalleriydi ve laboratuvar sisteminde solunum yolu enfeksiyonu tanısı olanlar çalışmaya dâhil edildi. Sistemdeki tanılar esas alındığı için enfeksiyonun akut, kronik veya alt, üst ayrımı yapılamadı. Çalışma kapsamına alınan 502 [217 (%43.2) kadın, 285 (%56.8) erkek] örneğin 467 (%93)'si çocuk, 35 (%7)'i erişkin hastalardan elde edildi. Nazofarengeyal sürüntü örneklerine; DFA, shell vial hücre kültürü ve multipleks PCR yöntemi aynı anda uygulandı. Hastaların yaş aralığı 5 gün ile 87 yaş (medyan: 1 yaş) arasındaydı. Nazofarengeyal sürüntü örnekleri santrifüjlendikten sonra, dipteki çökeltiden DFA, süpernatandan hücre kültürü ve multipleks PCR testleri yapıldı.

DFA testi: Dipteki çökeltiden alınan 100 µl örnek, 1000 g'de, 5 dakika hücre santrifüjünde çevrildi. Lamlar, -20°C'de, 10 dakika asetonda fikse edildikten sonra "fluorescein isothiocyana-

te” (FITC) ile işaretlenmiş poliklonal antikor (Respiratory Viral Screen and Identification DFA Kit, Millipore, Light Diagnostic, ABD) ile boyandı. Preparatlar CO₂’li etüvde 37°C’de, 30 dakika, nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda preparatlar floresan mikroskopisinde incelendi. Üç veya daha fazla floresan veren hücre görülen örnekler pozitif olarak kabul edildi. Pozitif bulunan örnekler, RSV, INF A/B, PIV 1-3 ve ADV monoklonal antikorları ile yukarıda tanımlandığı gibi yine boyanarak tiplendirildi.

Hücre kültürü: Klinik örnekler hücre dizilerine “shell vial” yöntemi ile ekildi. Her örnek için HEP-2 (RSV), Vero (PIV 1-3), A-549 (ADV) ve iki MDCK (INF A/B) (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ, Almanya-Vero hücre dizisi, Şap Enstitüsü, Ankara) hücre dizisinden oluşan beş adet shell vial tüpü hazırlandı. Süpernatandan alınan örnek, 0.45 µm por çapında filtreden geçirilerek her hücre dizisine 0.2 ml hacminde inoküle edildikten sonra tüpler 3200 g’de, 35°C’de, 30 dakika santrüflendi. Tüpler, 37°C’de 1 saat bekletildi ve daha sonra hücre dizileri üstündeki sıvı atılarak yerine 1 ml hacminde izolasyon besiyeri (Biochrom AG, Leonorenstr, Almanya) ilave edildi. Tüpler, 37°C’de %5 CO₂’li ve nemli ortamda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüplerden kültür sıvısı uzaklaştırıldı ve “shell vial”ler -20°C’de, 10 dakika asetonda fikse edildi. HEP-2 hücre dizisine inoküle edilen örnek RSV, A-549 hücre dizisi ADV, Vero hücre dizisi PIV 1-3, MDCK hücre dizilerinin biri INF A, diğeri tip INF B’ye özgül FITC ile işaretlenmiş monoklonal antikor (Millipore, Light Diagnostic, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda boyandı^(5,6). Preparatlar floresan mikroskopisinde incelendi. Bir veya daha fazla floresan veren hücre görülen örnekler pozitif kabul edildi.

Multipleks PCR: Süpernatandan, üretici firma-

nın önerileri doğrultusunda nükleik asitler ekstrakte edildi (Viral DNA/RNA Extraction Kit, iNtRON, Güney Kore). Ekstraksiyon işleminden sonra, revers transkripsiyon ile cDNA’lar sentezlendi (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits, Fermentas, ABD). İçeriğinde; solunum virüslerine özgül DPO primerleri, DNA polimeraz enzimi, dNTPs, mastermiks, 8-MOP çözümü bulunan “RV15 ACE Screening” [INF A ve B, RSV A/B, ADV, PIV 1-4, HBoV, HMPV, HRV A/B, HCoV OC43, 229E/NL63] (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak ısı döngü cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda 40 döngü yapıldı ve cDNA’lar çoklu amplifiye edildi. Amplifiye ürün tam otomatize “Screen Tape” çoklu tanımlama cihazına yüklendi. Bu cihazda, PCR ürününe mini poliakrilamid jellerde otomatize jel elektroforezi yapıldı ve sonuçlar “RV15 ACE Screening Software”i kullanılarak belirlendi.

BULGULAR

Bu çalışmada solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış hastalardan yaklaşık iki yıllık sürede laboratuvara gönderilen 502 nazofarengeyal sürüntü örneği incelendi. Çalışmada, hücre kültürü ve DFA yöntemlerinin her ikisinin sonuçları ile multipleks PCR test yönteminin sonuçları karşılaştırıldı. Uygulanan testlerin tümünün sonuçlarına göre, örneklerin 238’i (%47.4) pozitif, 264’ü (%52.6) negatif bulundu (Tablo 1). Hücre kültürü ve DFA yöntemlerinin her ikisinin sonucuna göre 189 (%37.6) örnek pozitif, 313 (%62.4) örnek negatif; multipleks PCR testi ile 233 (%46.4) örnek pozitif, 269 (%53.6) örnek negatif bulundu. Hücre kültürü ve DFA ile yalnızca klasik solunum virüsleri (RSV, INF A/B, PIV 1-3, ADV) saptanabildiği için klasik yöntemlerle saptanamayan diğer solunum virüslerinin tek başına pozitif olduğu 37 örnek karşılaştırma dışı bırakıldı. Ayrıca, hücre kültürü ve DFA ile saptanmayan diğer solunum virüsleri ile birlikte çoklu etkenler arasında yer alan 15

Tablo 1. Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin dağılımı*.

Grup	Virüsler	Toplam n (%)
Tek etken enfeksiyonu	RSV	110 (21.9)
	HRV	30 (6.0)
	INF A	26 (5.2)
	INF B	7 (1.4)
	ADV	10 (2.0)
	PIV 1	1 (0.2)
	PIV 2	1 (0.2)
	PIV 3	14 (2.8)
	PIV 4	1 (0.2)
	HMPV	3 (0.6)
	EV	1 (0.2)
	HCoV	1 (0.2)
	İkili etken enfeksiyonu	RSV + HRV
RSV+ADV		5 (0.2)
RSV+PIV 1		2 (0.4)
RSV+PIV 3		2 (0.4)
RSV+INF A		6 (1.0)
RSV+INF B		1 (0.2)
RSV+HMPV		1 (0.2)
HRV+PIV 3		1 (0.2)
HRV+ADV		1 (0.2)
HRV+EV		1 (0.2)
INF A+ADV	1 (0.2)	
Üçlü etken enfeksiyonu	RSV+HRV+HMPV	1 (0.2)
	RSV+HRV+HCoV	1 (0.2)
	RSV+HRV+HBoV	1 (0.2)
Pozitif		238 (47.4)
Negatif		264 (52.6)
Toplam		502

*Hücre kültürü, DFA ve multipleks PCR test yöntemlerinden en az biriyle pozitif saptanan sonuçlar verilmiştir. RSV: Respiratuar sinsişyal virüs; ADV: Adenovirus; INF A/B: İnfluenza virüs tip A ve B; PIV 1-3: Parainfluenza virüs tip 1-3; HRV A/B: Human rhinovirus A/B; EV: Enterovirus; HCoV: Human coronavirus; HBoV: Human bocavirus; HMPV: Human metapneumovirus

örnekteki klasik solunum virüsleri karşılaştırma kapsamına alındı (Tablo 2). Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, PPV, NPV ve test geçerlilik oranları sırasıyla %97.3, %95.7, %93.9, %98.1 ve %96.3 olarak bulundu.

Solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda RSV %21.9, HRV %6.0 ve INF A %5.2 oranında pozitif bulundu. Hastaların %6.6'sında çoklu etken enfeksiyonu görüldü. En fazla RSV ve HRV birlikteliği görüldü. Hücre kültürü ve/veya DFA ile pozitif bulunan 5 örnek [RSV, INF B,

Tablo 2. Hücre kültürü/DFA yöntemi ile multipleks PCR yönteminin karşılaştırılması.

Multipleks PCR	+	-	Toplam
+	184	12	196
-	5	264	269
Toplam	189	276	465

DFA: Direkt floresan antikor

ADV, INF A (n=2)] multipleks PCR ile negatif bulundu. Multipleks PCR ile pozitif bulunan 12 [RSV(n=4), INF A (n=2), ADV, INF A+RSV (n=4), ADV+RSV] örnek ise hücre kültürü ve/veya DFA ile negatif bulundu.

TARTIŞMA

Virüsler solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan etkenlerin başında yer alır. Viral solunum yolu enfeksiyonları sağlıklı erişkinlerde hafif klinik tablo ile seyrederken, özellikle yaşlılarda, immun yetmezlikli kişilerde ve çocuklarda ciddi morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilir. Bu yüzden viral solunum yolu hastalıklarının doğru ve hızlı tanısı, gerekli tedaviyi uygulamak, enfeksiyon bulaşını sınırlamak ve gereksiz antibiyotik kullanımını engellemek ve buna bağlı olarak da diğer bakteriyel etkenlerin direnç kazanmasını önlemek için gereklidir⁽⁷⁾.

Solunum virüslerini saptamada kullanılan konvansiyonel yöntemler hücre kültürü (tüp kültürü, shell vial) ve DFA testleridir. Solunum virüslerinin saptanmasında hücre kültürü altın standart yöntem olmasına karşın olumsuz transport koşullarından testin etkilenmesi, her etken için ayrı hücre dizisi hazırlama gerekliliği, kısıtlı sayıda etkeni belirleyebilmesi, test süresinin 48 saatte sonuçlanması gibi dezavantajları bulunmaktadır. DFA ise yaklaşık bir saatlik sürede sonuçlanabilmesine rağmen, örnek kalitesinden testin etkilenmesi ve hücre kültürüne göre duyarlılığının daha düşük olması kullanımını sınırlamaktadır^(4,8,9). Shell vial hücre kültürü ve

DFA ile solunum yolu enfeksiyonlarının büyük bir bölümünü oluşturan, RSV, INF A/B, ADV, PIV saptanabilmektedir. Ancak, HCoV, HMPV, HBoV, PIV 4 gibi virüsler de önemli etkenler arasındadır. Human coronavirus, HRV ve HMPV hücre kültüründe geç ve güç üretilibildikleri için, HBoV ise hücre kültüründe üremediği için bu solunum virüsleri yalnızca nükleik asit testleri ile saptanabilmektedir⁽⁸⁾.

Bu çalışmada, akut solunum yolu enfeksiyonu tanılı hastalarda solunum virüslerinin saptanmasında konvansiyonel yöntemlerle (shell vial hücre kültürü yöntemi ve DFA) multipleks PCR test yöntemini karşılaştırılarak, multipleks PCR testinin performansı değerlendirilmiştir. Tüm testlerin toplam sonuçlarına bakıldığında incelenen 502 nazofarengeyal sürüntü örneğinin yaklaşık %48'i pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile örneklerin %37.6'sı, multipleks PCR testi ile %46.4'ü pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile yalnızca klasik solunum virüsleri (RSV, INF A/B, PIV 1-3, ADV) saptanabildiği için klasik yöntemlerle saptanamayan diğer solunum virüslerinin tek başına pozitif olduğu 37 örnek karşılaştırma dışı bırakılmıştır. Hücre kültürü ve DFA ile negatif bulunan 12 örnek [RSV(n=4), INF A (n=2), ADV, INF A+RSV (n=4), ADV+RSV] multipleks PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Hücre kültürü ve DFA ile pozitif bulunan 5 örnek de [RSV, INF B, ADV, INF A (n=2)] multipleks PCR ile negatif bulunmuştur. Her iki yöntem karşılaştırıldığında pozitif bulunan tekli etkenler neredeyse birbirine benzer olmakla birlikte, multipleks PCR'in ikili etkenleri saptamada hücre kültürü ve DFA'ya üstün olduğu görülmüştür. Bu çalışma retrospektif olarak gerçekleştirilmiş ve test yinelemeleri yapılamamıştır. Bu yüzden "yanlış pozitif" yorumu yapılamamıştır. Ancak genel olarak bakıldığında hücre kültürü ve DFA ile en çok RSV'nin saptanamadığı görülmüştür. Diğer solunum virüslerine göre RSV ısı farklılıklarından en fazla etkilenen virüsdür⁽¹⁰⁾. Bu da hastane-

mizde transport koşullarında bazı sorunlar olduğunun göstergesidir. Multipleks PCR yöntemi de en fazla influenza virüslerini saptamada yetersiz kalmıştır.

RSV (%21.9), HRV (%6.0) ve INF A (%5.2) solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda sırasıyla en sık saptanan solunum virüsleri olmuştur. Hastaların %6.6'sında çoklu etken enfeksiyonu görülmüştür. Daha önce laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmanın verileri ile bu çalışma sonuçları benzer bulunmuştur⁽¹¹⁾. Çoklu etkenlerin azımsanmayacak oranda olduğu ve klasik yöntemlerin çoklu etkenleri saptamada yetersiz olduğu görülmektedir. Ayrıca çoklu etkenlerin önemli bir bölümünden sorumlu olan HRV'nin konvansiyonel yöntemlerle saptanamaması da bu yöntemler için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Hücre kültürü ve DFA'ya göre multipleks PCR yönteminin duyarlılığı %97.3, özgüllüğü %95.7, PPV %93.9, NPV %98.1 ve test geçerlilik oranı %96.3 olarak bulunmuştur. Daha önce yapılan araştırmalarda olduğu gibi bu çalışmada da multipleks PCR yönteminin klasik yöntemlerden daha duyarlı olduğu görülmüştür^(8,12,13). Multipleks PCR'in daha duyarlı olmasının yanı sıra hızlı ve doğru sonuç vermesi de klinik ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Hızlı sonuç; öncelikle influenza salgını gibi durumlarda gerekli antiviral tedaviye başlamak, gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek, gerektiğinde nozokomiyal bulaşı engellemek için damlacık izolasyon önlemlerini almak, tanı koymak için ileri ve gereksiz tetkikleri yapmamak, saptanan virüsle ilgili halk sağlığı ile ilgili bilgileri vermek açısından son derece önemlidir⁽¹³⁾.

Multipleks PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu testle, hücre kültürü ve DFA'dan farklı olarak tek etken enfeksiyonlarında 37, çoklu etken enfeksiyonlarında ise tek başına iki, klasik solunum virüsleri-

ne ek patojenlerin saptanmasında 14 hastada daha pozitif bulunarak sonuçlara katkıda bulunmuştur.

Sonuç olarak, multipleks PCR'nın klasik yöntemlerle tespit edilemeyen virüsleri de saptayabildiği, klasik yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç verdiği, örnek kalitesinden etkilenmediği, duyarlı ve özgüllüğünün yüksek olduğu, aynı anda birden fazla örnek çalışılabildiği için iş yükünü de azalttığı görülmüştür. Bu nedenle multipleks PCR yönteminin rutin kullanıma uygun olduğu öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

1. TC Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı. 2012; 49-56.
2. **World Health Organization.** Global Health Observatory (GHO) data. World Health Organization, 2012. [http://www.who.int/gho/countries/tur.pdf] (Erişim tarihi: Haziran 2015).
3. **Tsukagoshi H, Ishioka T, Noda M, Kozawa K, Kimura H.** Molecular epidemiology of respiratory viruses in virus-induced asthma. *Front Microbiol* 2013; 4:278 .
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00278>
4. **Pérez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí M.** Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. *Open Virol J* 2012; 6:151-9.
<https://doi.org/10.2174/1874357901206010151>
5. **Wiedbrauk DL, Johnston SLG.** Manuel of clinical virology. Raven Press, New York, ABD, 1993.
6. **Çiçek C.** Hücre kültürü teknikleri: Tek tabaka hücre kültürlerinin üretilmesi ve idame ettirilmesi. In: Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT (ed). Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı. Vol 3, 3rd ed (Çeviri). [Clinical Microbiology Procedures Handbook In: Garcia LS, Isenberg HD, 3rd, ASM Press, Washington DC, 2007] Ankara: Atlas kitapçılık; 2014: 10.3.1-10.3.9
7. **Kim SR, Ki CS, Lee NY.** Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 2009; 156:111-6.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.11.007>
8. **Ginocchio CC, McAdam AJ.** Current best practices for respiratory virus testing. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9 Suppl):S44-8.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00698-11>
9. **Ecemiş T, Yılmaz Ö, Şanlıdağ T, Akçalı S, Yüksel H.** Üst solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda viral etkenlerin multipleks PCR ile araştırılması. *Behcet Uz Çocuk Hast Derg* 2012; 2:1-5.
10. **Schlaudecker EP, Heck JP, MacIntyre ET, et al.** Comparison of a new transport medium with universal transport medium at a tropical field site. *Diagn Microb Infect Dis* 2014; 80:107-10.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.018>
11. **Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, ve ark.** Akut solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda solunum virüslerinin prevalansı. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:188-200.
<https://doi.org/10.5578/mb.9024>
12. **Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P.** Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode®-PLx, and xTAG® respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol* 2011; 50:42-5.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.022>
13. **Mahony JB.** Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:716-47.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00037-07>