

MOLEKÜLER TANIDA TİCARİ SİSTEMLER

DNA • Strip Teknolojisinin “Line Probe Assay” Kullanımı

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi,
İstanbul

Günümüzde özellikle smear pozitif solunum örnekleri için doğrudan klinik örneklerden mikobakterilerin identifikasyonu amacıyla geliştirilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan pek çok ticari ürünler mevcuttur. Hedef çoğaltma, prob çoğaltma ve sinyal çoğaltma esaslı bu ticari ürünler ile kısa sürede (3-8 saat içerisinde) tüberküloz şüpheli hastaların laboratuvar tanısı mümkün olabilmektedir. Kültürde üretilen mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu ve TB ilaç direnci ile ilgili mutasyonların saptanması amacıyla üretilen prob hibridizasyon esaslı ticari ürünlerde tanıda sıklıkla kullanılmaktadır.

DNA • STRIP teknolojisinin mikobakteri türlerinin identifikasyonunda kullanılmasında türe özgü gen segmentlerinin tanımlanması esastır. Bu amaçla öncelikle kültürden veya hasta materyallerinden DNA izolasyonunu takiben, PCR ile hedefe özgü 16S-23S rRNA bölgesinin amplifikasyonu ve ardından hedef DNA dizisi komplementeri olan işaretli DNA problemlerle nitroselüloz bir membran üzerinde revers hibridizasyon sonrası mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir.

Hibridizasyon aşamasında, amplifiye edilmiş ve biyotinle işaretli DNA materyali önce spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridize edilir. Hibridizasyon işlemini takiben ortama ilave edilen alkalen fosfatazla işaretlenmiş streptavidin ortamda bulunan hibride bağlanır. Kromogen ile inkübasyon sonrası, biotin-streptavidin bağlanması kolorometrik bir sistemle tespit edilerek görsel olarak yorumlanmaktadır.

Mikobakterin moleküler tanısında kullanılmak üzere ticari olarak mevcut DNA strip teknolojisi ile üretilmiş bir revers hibridizasyon yöntemi olan Line Probe Assay (LİPA)’ler arasında doğrudan hasta örneğinden identifikasyon amaçlı GenoType® Mycobacteria Direct (Hain Lifescience, Nehren- Germany) kullanılırken kültür ortamından tüberküloz tanısına gidilebilen ticari ürünler arasında INNO-LİPA Mycobacteria 2V (Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium), GenoType® MTBC,

GenoType® Mycobacterium CM ve GenoType® Mycobacterium AS (Hain Lifescience, Nehren- Germany) ile Rifampicin ve INH direncini belirlemeye yönelik GenoType® MTBDR (Hain Lifescience, Nehren- Germany) ve sadece Rifampicin direnci için INNO-LiPA Rif TB (Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium) yer almaktadır. Bu testlerin ortalama süresi amplifikasyon sonrası 3-4 saat kadardır.

A. HASTA ÖRNEKLERİNDEN DİREKT TANIDA “LINE PROB ASSAY” KULLANIMI

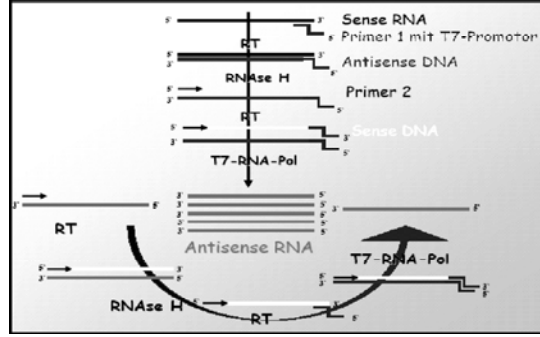
Bu amaçla DNA strip teknolojisi ile üretilen GenoType® Mycobacteria Direct (Hain Lifescience, Nehren- Germany) ticari olarak mevcuttur. Hedef RNA'nın izolasyonunu takiben İki ana kategoride gerçekleşen bu testin süresi yaklaşık 4 saattir. Hazırlanan hasta örneklerinden ekstrakte edilen mikobakteriye ait hedef rRNA, öncelikle izotermal olarak NASBA (Nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon) yöntemi ile 41°C'de amplifiye edilir. (Thermalcycler ihtiyacı yoktur). Amplifikasyonu takiben Revers hibridizasyon reaksiyonu esasına göre üretilmiş striplerde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilerek identifikasyon sağlanır. Yüksek özgüllüğe sahip olan bu test ile klinik olarak önemli mikobakteri türlerinden M. tuberculosis complex, M. malmoense, M. avium, M. kansasii ve M. intracellulare tanımlanabilmektedir.

I. NASBA Reaksiyonu; Bu reaksiyon için üç farklı enzim kullanılmaktadır. Revers transkriptaz (RT), RNA Polimeraz (T7-RNA-Pol) ve RNase H. Hedef, ribozomal RNA olup aynı zamanda canlı basil varlığının gösterilmesine olanak sağlar. Çalışmada 500 µl dekontamine edilmiş hasta örneği ile 4 (dört) saatte sonuç elde edilir. Tercihan pulmoner örneklerde ve ayrıca ekstrapulmonar örneklerden çalışılabilmektedir.

Reaksiyon üç aşamada gerçekleşir:

1. aşama, Hedef RNA'nın (sense RNA) birinci primer yardımıyla RT enzimi sayesinde DNA kopyası çıkarılır.
2. aşama, ortamdaki DNA:RNA hibritindeki RNA molekülü, RNase H tarafından kesilerek uzaklaştırılır.
3. aşama, İkinci primer ile RT enzimi aracılığıyla DNA'nın kopyası çıkarılır. Bunu takiben T7-RNA-Polimeraz enzimi aracılığı ile bu DNA molekülünden RNA kopyası

oluşturulur. Elde edilen bu kopya antisense RNA molekülüdür. İşlemler bu basamaktaki gibi tekrar edilirler ve sonuçta milyonlarca kopya RNA amplikonları elde edilmiş olur (Şekil-1).

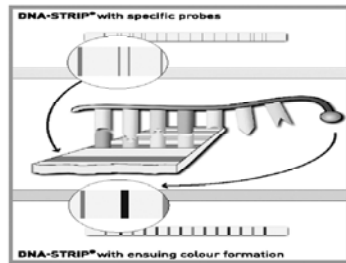


Şekil 1: NASBA reaksiyonu

II. REVERS HİBRİDİZASYON;

- Önce hasta örneğinden NASBA reaksiyonu ile elde edilen amplifikasyon ürününün kimyasal denatürasyonu,
- Bunu takiben membrana bağlı problemlerle tek sarmallı, biyotinle işaretli amplikonların hibridizasyonu (Şekil 2).
- Yıkama işleminin ardından ortama ilave edilen streptavidin/alkalin fosfataz (AP) konjugat ile hibritler boyanması,
- Kurutulan strip üzerinde oluşan bantların değerlendirilerek identifikasyon işleminin tamamlanması.

Amplifikasyon ve hibridizasyon işlemi yaklaşık 4 saat sürmektedir.



Şekil 2 : Özgül problemlerle revers hibridizasyon reaksiyonu

GenoType® MTBC (Hain Lifescience, Nehren- Germany) , yetersiz üremenin olduğu kültürler kadar, hızlı ve yavaş üreyen Mikobakterilere ait karışık kültürlerden tek bir prosedürde *M. tuberculosis complex*'ine ait tüm türlerin (*M. tuberculosis*, *M. africanum* I, *M. microti*, *M. bovis* spp.*bovis*, *M. bovis* BCG , *M. bovis* spp.*caprae*) spesifik DNA problemleri yardımı ile ayırt edilebilmesini sağlamaktadır. Hedef, MTBC için spesifik 23S ribozomal RNA fragmanı ile MTBC türlerinin ayırt edilmesinde *gryB* gen fragmanı ve *M. bovis* BCG için RD1 delesyonudur. Multipleks PCR ile amplifikasyon sonrasında oluşan amplikonlar nitroselülöz membran stripleri üzerindeki spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridize edilerek tanı sağlanır.

INNO-LiPA Mycobacteria (Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium) ile sıvı veya katı besiyerlerinde üremiş olan 16 patojen mikobakteri (*M. tuberculosis complex*, *M. avium* - *M. intracellulare complex*, *M. chelonae* - *M. abscessus complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum*) PCR ve jel elektroforez işlemini takiben yaklaşık 3 saat içerisinde tanımlanabilmektedir. Mikobakterilerin rutin identifikasyonlarında yorumu ve çalışılması kolay bir yöntem olup konvansiyonel yöntem sonuçları ile uyumunun %99.6 , duyarlılık ve özgüllüğünün % 100 olduğu rapor edilmiştir. 1980 lerden beri bu amaçla kullanılan, ticari olarak mevcut olan AccuProbe (Gen-Probe) ile *M. tuberculosis complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* ve *M. gordonae* 'den oluşan sınırlı sayıda türün tanısı yapılabilmektedir. En önemli dezavantajı sınırlı sayıda tür için mevcut olan DNA problemlerinin her seferinde sadece bir mikobakteri türünün test edilmesi için kullanılmasına bağlı olarak maliyetinin fazla olmasıdır.

GenoType® Mycobacterium CM (Hain Lifescience, Nehren- Germany), *M. tuberculosis complex* ile birlikte yaygın olarak izole edilen diğer 13 patojen mikobakterilerin aynı anda identifikasyonuna olanak sağlayan bir diğer üründür. Bu türler, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. tuberculosis complex*, *M. xenopi* ve *M. abscessus* ' u kapsar.

GenoType® Mycobacterium AS (Hain Lifescience, Nehren- Germany) 16 Mikobakteri türünün identifikasyonuna olanak sağlayan bir üründür. Bu türler: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* ve *M. shimoidei* ' u kapsar.

A. MİKOBAKTERİLERDE İLAÇ DİRENCİNİN SAPTANMASINDA KULLANILAN TİCARİ ÜRÜNLER

Revers hibridizasyon esasına dayalı, DNA strip teknolojisi (LİPA) ile hazırlanan ticari ürünler arasında INNO-LİPA Rif TB ve GenoType® MTBDR yer alır. Bu ürünler, nitrosellülöz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probalar ihtiva ederler.

Uygulamada ;

- Kültür ortamında elde edilen ve direnç geni araştırılacak her izolat için PCR ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilir
- Takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu probalar ile hibridizasyona bırakılır
- Hibridizasyon sonrası Mutant dizilere bağlanma durumu “dirençli” olarak yorumlanır.

Test süresi yaklaşık 3-4 saat kadardır.

GenoType® MTBDR (Hain Lifescience, Nehren- Germany) aynı teknoloji ve test prensibine dayalı olarak geliştirilen ve Rifampicin ve INH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonları tespit edebilen bir üründür.

INNO-LİPA Rif TB (Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium) Sadece Rifampicin direncini araştırmada kullanılan aynı paralelde bir üründür.

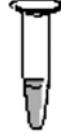
I. GenoType®MTBC Direct Çalışma Protokolü

- Hasta örneğinden RNA izolasyonu
- Amplifikasyon (NASBA)
- Revers hibridizasyon aşamalarından oluşur.

A. RNA İZOLASYONU

a. Hücre Parçalama (Denatürasyon):

- 2 ml'lik ependorf tüplere 300 µl inhibisyon önleyici buffer (IRB) pipetlenir. Vortekslenen dekontamine örnekten 500 µl alınarak IRB bulunan tüpe eklenir ve iyice vortekslenir.



300 l IRB Solüsyonu

+

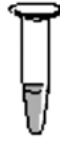
Vorteks

Ependorf tüpler 12.000 x g de 3 dakika santrifüjlenir.

Santifüj sonrası tüplerin dibinde oluşan pellete değmeden süpernetant çekilerek atılır. Pellet üzerine 100l RCB(RNA Capture Buffer) eklenir ve vortekslenerek pellet çözündürülür. Tüpler 95°Clik ısı bloğu ya da su banyosunda 15 dakika inkübe edilir.



3 dakika
12,000 x g



100 l RCB Solüsyonu

+

Vorteks

+

95°C de 15 dakika
inkübasyon

- Süre sonunda tüpler sonikatöre alınarak 60° C de 30 dakika inkübe edilir. Inkübasyon sonrası tüpler 5 dakika maksimum hızda santrifüjlenir.

- Santrifüj sonrası tüplerin dibinde oluşan pellete değmeden süpernetanttan 100 µl alınarak 0.5 ml lik (sarsted tube) tüplere alınır.



5 dakika
14,000-16,000 x g

NOT : Negatif kontrol için dekontamine örnek yerine 500 µl distile su kullanılır.

b. RNA 'ların Manyetik Boncuklara Bağlanması

- Kullanım öncesi Manyetic Boncuklar (MB) vortekslenerek çözündürülür.
- Pozitif Kontrol RNA (PC-RNA), RNA Capture Buffer (RCB)) ile 1:99 oranında seyreltilir.
- ICR/CP (Internal Control RNA/Capture Probe) miksi hazırlanırken;

Kit içerisinde 0.7 ml lik tüplerde çıkan ICR/CP üzerine 140 µl DMSO eklenir.

- RNA izolasyon aşamasında 0.5 ml lik (sarsted) tüplere alınan 100 µl RNA üzerine 90 µl ICR/CP ve 10 µl MB solüsyonlarından eklenir.



90 µl ICR/CP
+
10 µl MB

Vorteks
+
inkübasyon

- Tüpler twincubator cihazına yerleştirilerek 65 ° C de 10 dakika , 25° C de 17 dakika ugun programda inkübe edilir.
- Inkübasyon sonrası tüpler manyetik seperatöre yerleştirilerek 3 dakika bekletilir ve süre sonunda tüplerdeki sıvı manyetik boncuklara zarar vermeden atılır.
- Manyetik seperatörün metal bloğu çıkartıldıktan sonra tüplere 200 µl Wash Buffer (WB,renksiz) eklenerek vortekslenir ve seperatörün metal bloğu takılarak 3 dakika bekletilir.
- Süre sonunda tüplerdeki sıvı manyetik boncuklara zarar vermeden çekilir ve seperatörün metal bloğu çıkartılır.
- Tüplere 20 µl BB(Bead Buffer) eklenerek vortekslenir.



20 µl BB
+
Vorteks

B. AMPLİFİKASYON (NASBA)

- Amplifikasyon aşamasına geçmeden önce PNM (Primer/Nükleotid Karışımı) ve EML (Liyofilize enzim karışımı) hazırlanır.
- PNM (Primer/Nükleotid miksi) hazırlanırken; Örnek başına 30 µl olacak şekilde 23 µl PNM üzerine 7 µl DMSO eklenerek vortekslenir.
- EML (Enzim Miks Liyofilizatı) amplifikasyon aşamasına geçmeden 15 dakika önce hazırlanır. Liyofilize enzim karışımı içeren tüplere 44 µl EDB (Enzyme Dilution Buffer) eklenir. EML asla vortekslenmez !!!!
- Karışımlar hazırlandıktan sonra yeni 0.5 ml lik (sarsted) tüpler işaretlenerek tüplere 30 µl PNM, 10 µl LMB (Loaded Magnetic Beads) ve 20 µl PO (Parafin Oil) ilave edilerek vortekslenir.

- Tüpler twincubator cihazına konur ve ;
65 ° C 8 dakika
41° C 5 dakika
41° C 5 dakika inkübe edilir
- Bu aşama da tüplere 10 µl EML eklenir.
41° C 60 dakika NASBA amplifikasyonu yapılır.



30 µl PNM
+
10 µl LMB
+
20 µl PO
Vorteks

C. REVERS HIBRIDIZASYON (MANUEL):

Ön İşlemler:

- Çalkalamalı su banyosu ya da Twincubator'ün sısı 45 ± 1 °C'ye ayarlanır, ya da uygun AutoLipa programı açılır.
- Hybridization Buffer (HYB) ve Yıkama solusyonu (X-STR) 37- 45 °C'ye kadar ısıtılır.
- Konsantre konjugat (CON-C) ve Konsantre substrat (SUB-C) (+4 °C'de korunur) dışında ki diğer tüm solüsyonların oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.
- Uygun tüpler kullanılarak CON-C ve SUB-C kendi sulandırma solüsyonları (CON-D ve SUB-D) ile 1:100 oranında (Her bir strip için; 10 µl konsantre + 1 ml (1000 µl) Sulandırma solüsyonu) sulandırılır.

Not : CON-C her çalışma için taze olarak hazırlanır. SUB-C ise stok olarak hazırlanıp 4 hafta oda sıcaklığında ve de karanlıkta saklanabilir.

İşlem basamakları :

- 20 µl DEN (denatürasyon) solüsyonu her tray'in (striplerin yerleştirildiği plate) örneklerin çalışılacağı kuyucuklarının köşelerine pipetlenir.
- 20 µl PCR ile çoğaltılmış örnekler DEN solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
- Bu sırada pens ile her bir örnek için bir strip alınır ve striplerin işaretli ucu kurşun kalem ile numaralandırılır. Bu işlemler sırasında striplere çıplak el ile değilmemelidir. Stripler alt uçlarından pens ile tutularak çalışılmalıdır.
- Örneklerin konulduğu kuyucuklara dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml HYB (yeşil renkli solüsyon) solüsyonu konulur ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalanır.

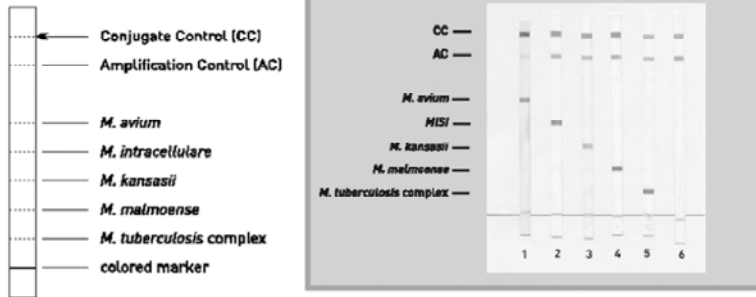
- Stripler dikkatlice trayin kuyularına yerleştirilir. (Bu sırada ters dönmüş stripler varsa bunlar pens veya temiz pipet ucu ile düzeltilmelidir. Stribin işaretli yüzü üste bakmalıdır. Herhangi bir kontaminasyonu önlemek için de pens her stripte temizlenerek kullanılmalıdır)
- Tray önceden hazırlanan su banyosu ya da Twincubator'da 50 ± 1 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
- Hibridizasyon solüsyonu pasteur pipet ya da vacum pompası kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltılır.
- Her bir kuyucuğa 1 ml X-STR (Stringent Wash Solution) (mavi renkli solüsyon) solusyonu eklenir ve 15 dakika 50 ± 1 °C'de çalakanarak inkübe edilir.
- STR solüsyonu, tray dikkatlice ters çevrilerek boşaltılır. Kuyucuklar içerisinde kalan bir miktar sıvıda yine tray ters çevrilerek üst ucu kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırılır.
- Bu basamak dan itibaren oda sıcaklığında çalışılır.
- Kuyucuklar da ki striplerin üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Konjugat eklenir ve 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası Konjugat dökülerek boşaltılır. Ve her bir strip 2 kez 1 ml RIN (Çalkalama Solüsyonu) 1 kez de 1 ml distile su ile 1'er dakika çalkalanarak yıkanır.
- Son yıkamadan sonra kuyucuklarda sıvı kalmamış olmasına dikkat edilmeli.
- Her bir strip üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Substrate solüsyonu eklenir ve karanlıkta test koşullarına bağlı olarak (oda sıcaklığı gibi) bantların oluşmasına göre 3 ile 20 dakika arasında çalkalamadan inkübe edilir (Çok uzun süreli inkübasyonlar stribin kararmasına sebep olabileceği ve de yanlış değerlendirmelere yol açabileceği için bu basamak inkübasyon süresi kontrollü bir şekilde takip edilerek sonlandırılmalıdır .)
- Bant oluşma işlemi striplerin iki kez distile su ile yıkanması ile sonlandırılır.
- Son olarak, stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kağıdının arasına konularak kurutulur ve değerlendirme aşamasına geçilir.
- Kullanım klavuzunda yeralan kriterler ölçüsünde sonuçlar değerlendirilmelidir.

GenoType® Mycobacteria Direct için Değerlendirme ve Sonuçların Yorumlanması:

Çalışmanın kabul edilebilir olması için aşağıdaki koşulların sağlanması gerekmektedir.

- 1) Konjugat kontrol; Konjugat kontrolü strip üzerinde konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Konjugat kontrol bandının oluşması gerekmektedir.
- 2) Amplifikasyon kontrolü: Hem RNA izolasyonunun uygunluğunu hem de NASBA reaksiyonunun işlevselliğini göstermektedir. Test doğru bir şekilde uygulanmışsa, amplifikasyon sırasında oluşan RNA kontrol ampliconları strip üzerindeki amplifikasyon kontrol bölgesine bağlanacaktır. Bu kontrol, izolasyon ve amplifikasyon sırasında oluşabilecek hataları ve izole edilen RNA kaynaklı amplifikasyon inhibitörleri tanımlamaktadır.

NOT: Eğer ne Amplifikasyon Kontrolü ne de herhangi bir Mikobakteriye özgü band oluşmamışsa sonuçlar geçerli değildir. Test tekrarlanmalıdır.

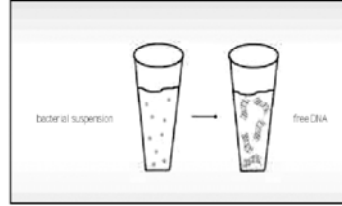


II. GenoType® MTBC, GenoType® MycobacteriumCM / AS ve GenoType®MTBDR Çalışma Protokolü

- Kültürden DNA izolasyonu
- Amplifikasyon (multipleks-PCR)
- Revers hibridizasyon
 - a) Amplifikasyon ürününün kimyasal denatürasyonu
 - b) Membrana bağlı problarla biyotin işaretli ampliconların hibridizasyonu
 - c) Yıkama
 - d) Streptavidin/alkalin fosfataz (AP) konjugat eklenmesi
 - e) AP aracılığıyla boyanma
 - f) Oluşan bandların değerlendirilmesi

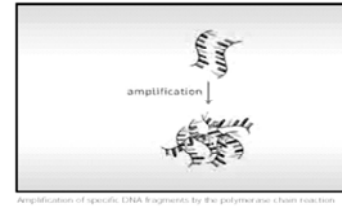
A. DNA İzolasyonu

GenoType® MycobacteriumCM / AS, GenoType® MTBC ve GenoType® MTBDR; türe özgü gen segmentlerinin tanımlanması temeline dayanan moleküler biyolojik testlerdir. Öncelikle bakteriyel DNA katı yada sıvı besiyerinden izole edilmelidir.



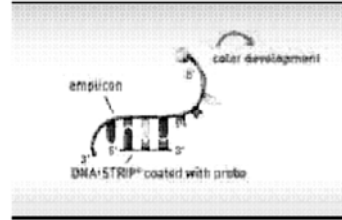
B. Amplifikasyon (multipleks-PCR)

Sonraki aşama elde edilen genomik bölgeden hedefe özgü DNA amplifikasyonudur. İşlem sonrasında elde edilen ürün (DNA parçaları) revers hibridizasyon için başlangıç materyalidir.



C. Revers Hibridizasyon

Saptanacak olan çeşitli DNA bölgelerini belirlemek için gerekli gen problemleri membran stripleri üzerinde sabitlenmiştir. Denatüre edilmiş DNA ampliconları, hibridizasyon sırasında gene özgü sabitlenmiş problemlere bağlanırlar. Biyotin işaretli ampliconların uygun problemlerle bağlanması ile oluşan hibritler, biyotin/streptavidinalkalin fosfataz kompleksi oluşumundan sonra NBT/BCIP ile boyanırlar. Oluşan bant patternlerinin, sağlanan kalıp ile karşılaştırılması sonuçların hızlı ve kolay yorumlanmasını sağlar.



Genel Çalışma Protokolü

DNA İzolasyonu:

- Katı besiyerinden, Öze ile bir miktar sürüntü alınır ve 300 µl distile su içerisinde vorteksenerek çözülür.

Sıvı besiyerinden: direkt 1 ml kültür alınır ve 15 dakika 10000 x g'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve bakteri peleti 100-300 µl distile su içerisinde vorteksenerek çözülür.

- Hazırlanan bakteri süspansiyonları 95 °C'de 20 dakika ısı bloğunda ya da kaynayan su banyosunda inkübe edilir.
- 15 dakika sonikasyona bırakılır.
- Örnekler 5 dakika yüksek devirde santrifüj edilir. Süpernatandan 5 µl alınarak direkt PCR da kullanılır.

NOT: Süpernatant başka bir tüpe aktarılarak uzun süre -20 °C'de saklanabilir.

Amplifikasyon (Multipleks-PCR):

- PCR ana karışımı (master mix) ayrı bir oda da hazırlanmalı ve örneklerden elde edilen DNA'lar farklı bir yerde ana karışıma eklenmelidir.
- Kaç tüp hazırlanacaksa aşağıdaki tabloda belirtilen miktar o sayı ile çarpılır. Negatif kontrol (DNA yerine 5 µl su pipetlenir) için toplam örnek sayısından 1 adet fazla hazırlanır

Reaktif	Miktar (1 tüp için)	PCR Protokolü:
PN Miks (PNM)	35 µl	95 °C ----- 05:00 dakika
10x PCR Buffer	5 µl	95 °C ----- 00:30 saniye
MgCl ₂	5 µl	58 °C ----- 02:00 dakika } 10 Döngü
TaqGold Polymerase	0.2 µl	95 °C ----- 00:25 saniye
Örnek	5 µl	53 °C ----- 00:40 saniye
Toplam PCR reaksiyon Hacmi	50 µl	70 °C ----- 00:40 saniye } 20 Döngü
		70 °C ----- 08:00 dakika

Revers Hibridizasyon (Manuel):

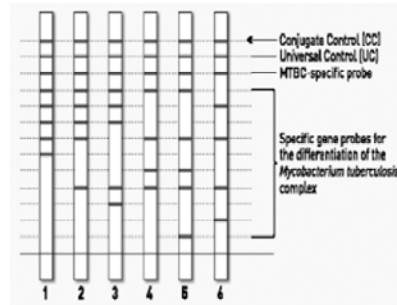
- GenoType®MTBC Direct Test Prosedüründe olduğu gibidir. Kullanılan reaktifler ile ilgili farklılıklar için ürüne ait kullanım kılavuzlarından yararlanılır.

GenoType® MTBC, INNO-LiPA Mycobacteria 2V , GenoType® Mycobacterium CM/AS Değerlendirme ve Sonuçların Yorumlanması:

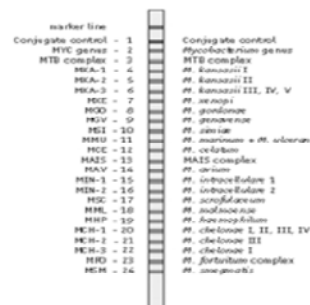
Sonuçlar kullanım klavuzunda yer alan kriterler ölçüsünde değerlendirilir. Çalışmanın kabul edilebilir olması için Konjugat kontrol, Universal kontrol ve Genus kontrol bantlarının varlığı ve şiddeti ile birlikte değerlendirilir. Tür düzeyinde tanımlamada bant paternlerinin yorumlanması ürüne ait bir okuma kartı ile birlikte gerçekleştirilir.

DEĞERLENDİRME

GenoType® MTBC

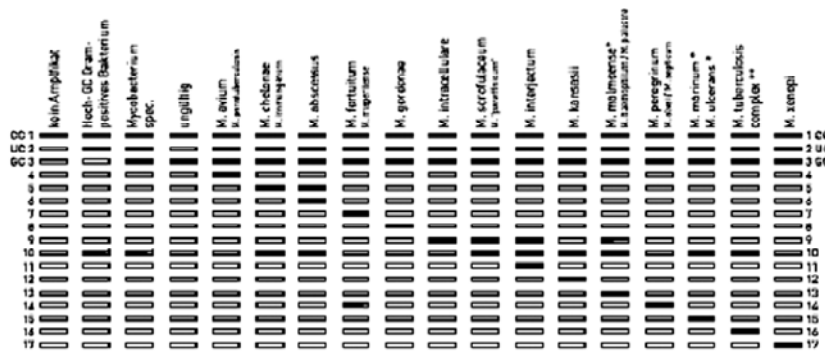


INNO-LiPA Mycobacteria 2V

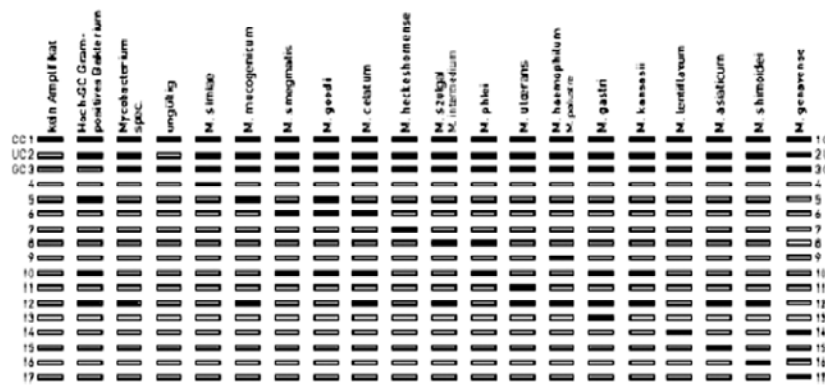


1. M. tuberculosis 2. M. africanum I 3. M. bovis
4. M. bovis caprae 5. M. bovis BCG 6. M. microti

GenoType® Mycobacterium CM



GenoType® Mycobacterium AS



GenoType® MTBDR için Değerlendirme ve Sonuçların Yorumlanması:

Sonuçlar kullanım klavuzunda yer alan kriterler ölçüsünde değerlendirilir. Çalışmanın kabul edilebilir olması için Konjugat kontrol, Universal kontrol ve M. tuberculosis complex (TUB) ait band larının varlığı ve şiddeti ile birlikte değerlendirilir. Tür düzeyinde tanımlamada band paternlerinin yorumlanması ürüne ait bir okuma kartı ile birlikte gerçekleştirilir.

1) M. tuberculosis complex (TUB)

Mycobacterium tuberculosis complex üyelerinden oluşan ampikonların varlığında band patterni oluşur. Eğer TUB bölgesinde band oluşmamışsa test edilen bakteri Mycobacterium tuberculosis complex'e ait değildir ve bu sistemle değerlendirilemez.

2) rpoB ve katG

İlgili gen bölgelerini (rpoB uni ve katG uni) göstermektedir. Vahşi (Wild) tip bölgesinde oluşan bandlar duyarlılığı, mutasyon bölgelerinde oluşan bandlar ilaç direncini belirlemektedir. Vahşi tip bölgesinde çıkmayan herhangi bir pattern çalışılan örneğin dirençliliğini göstermektedir.

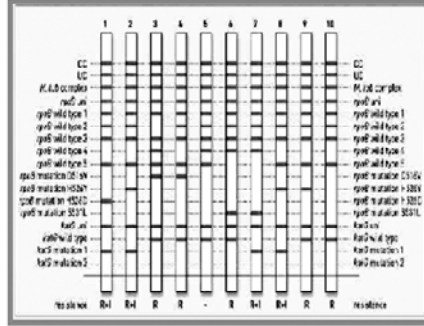
3) rpoB probları

rpoB Uni bölgesi, genin rpoB'ye özgü bölgesini göstermektedir ve her zaman bu bölgede band oluşmalıdır. Beş farklı rpoB vahşi gen bölgesi (rpoB WT 1-5) ve dört adet mutant (rpoB MUT: D516V, H526Y, H526D ve S531L) bölgesi bulunmaktadır. Band şiddeti Universal kontrol band şiddeti kadar veya daha güçlü olan band patternleri değerlendirmeye alınır.

- İlgili bölgeler rpoB vahşi tip veya mutant geni belgelemektedir. Vahşi tip bölgesindeki tüm bandlar oluştuğunda çalışılan gen bölgesinde mutasyon yok demektir. Eğer mutasyon varsa,
- ilgili ampikon vahşi tip probuna bağlanamayacaktır. En azından bir vahşi tip bölgesinde band oluşmaması çalışılan örnekte rifampicin direnci olduğunu göstermektedir.
- Rif direncine sebep olan ve sık gözlenen bu dört mutasyondan herhangi biri saptandığında (rpoB MUT: D516V, H526Y, H526D ve S531L), ilgili vahşi tip bölgesinde band oluşmaması gerekmektedir.

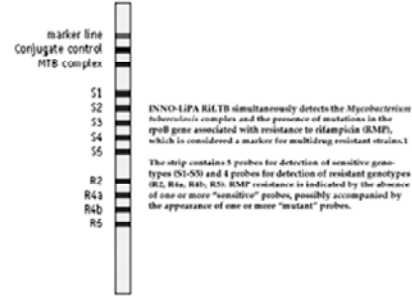
DEĞERLENDİRME

GenoType®MTBDR;



Rifampicin: rpoB geni (RNA polimerazın
β - subunitisini kodlayan bölge)
Isoniazid: katG geni (katalaz peroksidad)

INNO-LiPA Rif TB



INNO-LiPA RIF TB simultaneously detects the Mycobacterium tuberculosis complex and the presence of mutations in the rpoB gene associated with resistance to rifampicin (RMP), which is considered a marker for multidrug resistant strains.1

The strip contains 5 probes for detection of sensitive genotypes (S1-S5) and 4 probes for detection of resistant genotypes (R1, R2, R3, R4). RMP resistance is indicated by the absence of one or more "sensitive" probes, possibly accompanied by the appearance of one or more "resistant" probes.

KAYNAKLAR

1. Alcaide F., Benitez M.A, Escriba J.M, Martin R.: Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT Systems for recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens and for species identification by DNA AccuProbe . Journal of Clinical Microbiology, Jan.2000, p.398-401
2. Richter E, Weizenegger M, Fahr AN, Rusch-Gerds S. Usefulness of the GenoType Assay for Differentiating Species of the Mycobacterium tuberculosis complexes in cultures obtained from clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology. p4303-4306, Vol.42, No.9 Sept.2004
3. Richter E, Weizenegger M, Fahr AN, Rusch-Gerds S, Nermann S. Evaluation of GenoType MTBC assay for the differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Journal of Clinical Microbiology, p 2672-75, Vol.41, No.6, June 2003
4. Weizenegger M, Hengstler M, Feldmann K, Fahr AM,. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex and four nontuberculous mycobacteria : Preliminary data of an evaluation in a hospital and a private laboratory . 25.th Annual Congress of The ESM, Italy, 27-30 June 2004
5. Alp A.: Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler. 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, Sayfa: 95-99, 2004
6. Bogard M, Vincelete J, Antinozzi R, et all. : Multicenter study of Commercial, Automated Polymerase Chain Reaction System for the Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2001) 20 : 724-731

7. Coll P, Garrigo M, Moreno C, Marti N. Routine use of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) test for detection of Mycobacterium tuberculosis with smear-positive and smear-negative specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 Sep;7(9):886-91.
8. Cloud J.L, Neal H, Rosenberry R, et al.: Identification of Mycobacterium spp. by using a commercial 16 S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* (2002) Feb; 40(2):400-6
9. Çavuşoğlu C.: Mikrobiyoloji laboratuvarında tanı ve direnç saptamada hızlı yöntemler. Ağaçfıdan A., Anđ Ö. (Edt), 70.Yıl Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti ,70.Yıl Bilimsel Toplantı Kitabı, "Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Hızlı Tanı ve Otomasyon Simpozyumu" , sayfa 110-122, İstanbul – 2001
10. Johansen I.S, Thomsen V, Johansen A, Andersen P, Lundgren B.: Evaluation of a New Commercial Assay for Diagnosis of Pulmonary and Nonpulmonary Tuberculosis . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2002) 21 : 455-460
11. Kocagöz T.: Tübeküloz tanısında yenilikler. H.Eraksoy, O.Ş.Yenen (Edt.),İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik mikrobiyoloji 2000, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Yayınları. No.19 , sayfa :25-33, 2000
12. Mijs W, De Vreese K, Devos A, et al.: Evaluation of a commercial line probe assay for identification of mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2002) Nov;21(11) : 794-802
13. Miller N , Cleary T, Kraus G, Young A.K, Supruill G, Hnatyszyn H.J.: Rapid and specific detection of Mycobacterium tuberculosis from Acid-Fast Bacillus smear positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by using florogenic probes and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* (2002) Nov; 40(11):4143-4147
14. Miller N, Infante S, Cleary T.: Evaluation of the LIPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* (2000) May; 38(5):1915-19
15. Philip A.L., Antonino C.: Guidelines for using a new technology in clinical practice. TB or not TB ? Rapid tests for pulmonary tuberculosis. *The journal of Respiratory disease* , Vol. 18. No.3 March 1997, p: 299-308 .
16. Saniç A. : Mikobakterilerin tanısında moleküler yöntemler ve standardizasyon. Öztürk R (edt.), XI .Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, sayfa; 159-161 , 30 Mart-3 Nisan 2003 ,İstanbul
17. Suffys P.N, Rocha A.S, Oliveria M. et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LIPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, Dec.39(12);.4477- 82
18. Yee YC, Gough A, Kumarasinghe G, Lim TK : The pattern of utilisation and accuracy of a commercial nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in routine clinical practice. *Singapore Med J* 2002 Aug ; 43(8):415-20

