

TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER TANISINDA TİCARİ SİSTEMLER

“İzotermal Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu Tekniğinin Kullanımı” *Strand Displacement Amplification (SDA)*

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi,
İstanbul

Tüberküloz (TB), dünyada önemi hergün artmakta olan ve halk sağlığını tehdit edebilen major tehlikelerden biri olup en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalıklarından biridir. TB olgularının %95'ten fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinden fazlası *M.tuberculosis* ile enfektedir. TB hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle ulusal TB kontrol programları çerçevesinde mikobakteriyoloji laboratuvarlarının birincil amacını, insidansı düşürmek için enfeksiyöz akciğer tüberküloz olgularının en kısa sürede tespiti, doğru identifikasyonu ve tedavisinin takibi oluşturur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede önemli bir role sahiptir.

Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etken mikroorganizmanın konvansiyonel olarak direkt bakıda tespiti ve laboratuvarda üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda “gold standart” kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Laboratuvar tanı için her iki yöntemin de önemli eksiklikleri vardır. Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin görülebilmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Kültür ile örnekteki birkaç canlı bakterinin dahi gösterilebilmesi mümkündür ancak mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olduklarından bu testlerin tamamlanması için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Son yıllarda TB ilaçlarına dirençli basillerin izolasyonlarındaki artış ve tanıya yönelik konvansiyonel testlerin pratik olmamaları, uzun zaman gerektirmeleri ve tür düzeyinde tiplendirmede yetersiz kalmaları rutin kullanımda sorunların çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir.

Bu amaçla son 15-20 yıl içinde mikobakterilerin hastalık örneklerinden ve katı-sıvı kültür ortamlarından saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ve duyarlılık testleri için, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı sonuç verebilen ve kolay uygulanabilir yöntemler üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. Bunlardan, Radyometrik (*BACTEC*) ve kromatografik (*HPLC*) sistemler, nukleik aside dayalı moleküler yöntemler, mikobakteriyofajlarla RIF direnç tayini (Faj amplifikasyonu)

gibi fenotipik ve genotipik teknikler tanı süresini kısaltmada ve tedaviye yönelik antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında umut verici yöntemlerdir.

Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak MTBC varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı sistemler ile kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya TB ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamada, Klasik PCR ve RFLP'nin yanısıra DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sequence analiz kitleri ve moleküler biyoloji ile bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA microarray teknolojisi ürünler tanıya hız kazandırmıştır.

Özellikle Smear pozitif solunum örneklerinde kullanımına FDA tarafından onay verilen nükleik asit amplifikasyon temeline dayanan ticari moleküler sistemlerden (Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD, Gen-Probe) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (Roche Diagnostic System)) ile FDA onayı olmamakla birlikte diğer kuruluşlardan onay almış ve satışa sunulmuş olan **BD ProbeTec™ET** *Mycobacterium tuberculosis* complex **DIRECT TB** (DTB, BD Biosciences)' e ait çalışma sonuçları klinik değerlendirmelerde yüksek sensitivite ve spesifite gösterebilmektedir.

CDC (Center for Disease Control and Prevention)'nin önerileri doğrultusunda tüberkülozun laboratuvar tanısına yönelik hızlı testler arasında yer alan DNA amplifikasyon teknikleri günümüzde rutin tanıda önemli bir yere sahiptir. Bu tekniklerden biri de Dizi Yer Değiştirme Amplifikasyonu "Strand displacement amplification, SDA" dır.

Bu kursta, SDA teknolojisi prensibi ile çalışan ve 3.jenerasyon bir ticari sistem olan **BD ProbeTec™ET**'nin doğrudan solunum örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* complex'in saptanması amacı ile üretilmiş Direct TB saptama kitinin (DTB) uygulamalı eğitimi verilecek BDProbe Tec ET sistemi ve SDA tekniği tanıtılacaktır.

BDProbe Tec ET sistemi, nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı bir yöntem olan SDA prensibi ile çalışan ve floresan enerji transfer saptama teknolojisiyle birleştirilmiş, direkt olarak hastaya ait solunum örneklerinde (balgam, indüklenmiş balgam, BAL ve diğer solunum örnekleri) ve/veya pozitif kültürlerde *M.tuberculosis* complex'e ait genetik materyali izotermal olarak hedef çoğaltıp saptayabilen, kullanım kolaylığı olan yarı otomatize bir sistemdir.

Hedef DNA, özgül primerler, DNA polimeraz, restriksiyon enzimi ve floresan işaretli saptama probu SDA tekniğinin ana bileşenlerini oluşturur. Bu sistem için primer amplifikasyon hedefleri IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA genidir. Söz konusu sistem, örneklerdeki hedef DNA'nın amplifikasyonu ve saptanmasını kapalı bir sistem formatında, SDA için gerekli reaktiflerle kaplanmış

koparılabilir stripler halindeki kuyucuklarda gerçekleşirken aynı zamanda kontaminasyona karşı kısmen güvenli bir ortam sağlar. Sistemde, inhibitör varlığını saptamak amacıyla internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kullanılır. Böylece yalancı negatiflikler önlenilmekte ayrıca kalite kontrol amaçlı pozitif ve negatif kontroller kullanılarak test sonuçlarının güvenilirliği arttırılabilmektedir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü smear pozitif solunum örneklerinde oldukça iyidir. Testin tedavi görmekte olan hastalarda kullanımı önerilmemekle birlikte tedaviye yeni başlanmış (1haftadan daha kısa süreli) hastalarda takip amaçlı kullanılabilir. Hasta örneğinden *M.tuberculosis complex*'in BDProbeTec ET sistemi ile saptanma süresi total olarak yaklaşık 3.5 saat'tir

BD ProbeTec™ ET *Mycobacterium tuberculosis complex* DIRECT TB (DTB)

TESTİN ÇALIŞMA PRENSİBİ

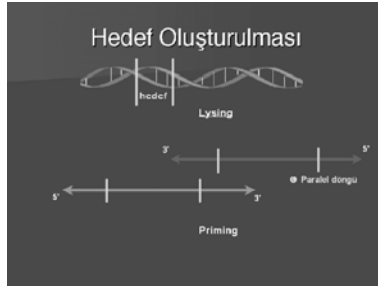
BD ProbeTec™ ET, *Mycobacterium tuberculosis complex* (DTB) Direct Detection Testi, amplifikasyon primerleri ve floresan işaretli dedektör prob lar kullanılarak şüpheli hastalara ait özellikle NALC-NaOH ile dekontamine edilmiş solunum örneklerinde bulunan *M.tuberculosis complex*'e (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* ve *M.microti*) ait hedef DNA (IS6110 insersiyon dizisi)'nın aranması ve eş zamanlı amplifikasyonu esasına dayanır.

Bu amaçla, kurutulmuş, oda ısısında saklanabilen, SDA için gerekli reaktiflerle kaplı, koparılabilir stripler halindeki disposable priming ve amplifikasyon kuyucukları kullanılır. Test sırasında çalışmaya ayrıca bir reaktif eklemeye gerek duyulmaz. Hazırlanmış hasta örneği, ilk önce içerisinde primerler, floresan işaretli detektör prob ve amplifikasyon için gerekli diğer reaktifleri içeren priming kuyucuklarına inokule edilir. İnkübasyonu takiben kuyucuklardaki reaksiyon karışımı, içerisinde SDA için gerekli bir DNA polimeraz (*Bst* DNA polimeraz) ile bir restriksiyon enzimi (*BsoB*-I) ve dNTP'ler ile kaplı amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır. Amplifikasyon kuyucuklarının üzeri kontaminasyonu önlemek amacıyla kapatılır ve cihaza yerleştirilerek inkübasyona bırakılarak test edilir. Sistemde, reaksiyonlar örnek ve kontroller birarada eş zamanlı olarak gerçekleşir. DNA polimeraz , tek sarmallı zincir üzerinde 5' – 3' yönünde uzamayı başlatır, çoğaltılan çift sarmallı DNA üzerinde 4-8 baz çiftlik spesifik hedef bölge restriksiyon enzimi ile tanınarak kesilir. Kesme işlemi sonrası paralel döngüye gönderilen hedef DNA, ortamda bulunan saç tokası yapısı gösteren floresan işaretli detector prob larla hybridize olarak, sistem tarafından Floresan Enerji Transferinin eşzamanlı amplifikasyonu sonucu saptanır.

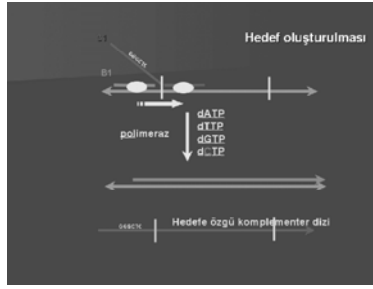
Bu reaksiyonu detaylı olarak açıklarsak; Öncelikle hasta örneğinde aranılan hedef DNA, ısı veya kimyasallarla denature edilerek heliks yapısındaki iki

zincir birbirinden ayrılır ve tek zincirli yapıya dönüştürülür. DNA zinciri üzerinde yer alan ve sadece aranılan patojene spesifik bir alan, SDA ' için hedef bölge olarak kullanılır. Yöntemde kullanılan primerler ise hibrit çifti oluşturmak üzere bu hedefe bağlanan komplementer DNA problemleridir. SDA için diğer bileşenlerden olan DNA polimeraz ortamdaki serbest nükleotidlerin (dNTP) bir şablon halinde DNA zincirine bağlanarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru uzamasını ve kalıp (template) DNA oluşumunu katalize eder. SDA'da iki primer (S1 ve B1) zincire 5' ucundan bağlanır. Polimeraz etkisi ile ortamdaki serbest nükleotidler kullanılarak 5'-3' istikametinde uzama gerçekleşir ve komplementer tarzda DNA zinciri oluşmaya başlar. S1 ve B1 in her ikisinde B1 yönünde uzarken S1 zinciri, orjinal 5'-3' hedefin komplementeri tek zincire dönüşür. Uzama bir uca sonlanır ve içerisine dCTPS (*deoksisitidin 5'- tiotriyofosfat sitozin*) dahil olur. Bu zincir ona bağlanan S2 ve B2 primerlerine komplementer olan sekansları içerir. Bu zincire bağlanan S2 ve B2 primerleri uzatarak S1 ve S2 orjinal primerleri ile sınırlandırılmış bir hedef bölgesi içeren tek zincir oluşturur. Artık S1 komplementeri ve orjinal hedef dCTPS içerir. Buna S1 primeri bağlanır ve çift sarmallı DNA oluşturmak üzere uzar. Restriksiyon enzimi (*BsoB-I*, restriction endonuclease) S1 orjinal primeri spesifik sekansından keser. Ancak S1 komplementeri dCTPS içerdiğinden S1 komplementer kopyasını kesemez. Bu kesilmiş kısım polimerazın etkisiyle uzadıkça geride kalan S1 primeri itilmek suretiyle hedef kopya paralel döngüye gönderilir. Bu döngü test süresince süreklilik arzeder ve ortamda milyonlarca kopya oluşur.(Şekil 1-6) Oluşan bu hedef DNA'lar, ortamda bulunan ve "saç tokası" yapısı gösteren floresan işaretli detector problemlerle eşzamanlı hibridize olur. Bu reaksiyonda her iki floresan molekül birbirlerine yakın iken floresine gönderilen enerji, floresineinden Rodamini aktive etmek için transfer edilir. Sonuçta sistem otomatik olarak pleyttteki kuyucuklardan gelen floresan sinyalleri 60 dakikalık test süresince otomatik okuyucuda dakikada bir kez okuyarak RFU (*rölatif floresan ünitesi*) olarak saptayıp hesaplama yapar (Şekil 7-10) . Bu değerlendirme için MOTA (*Method other than acceleration*) skoru belirlenir. Bu skor, reaksiyon sonrasında oluşan sinyalin değerlendirilmesi ve ölçülmesinde kullanılır. Ortamda aranılan hedefin var olup olmadığı, hesaplanan MOTA değeri ile hasta örneği veya kontrol için daha önceden belirlenen "cut-off MOTA" değerlerinin karşılaştırılması ile kalitatif olarak saptanır.

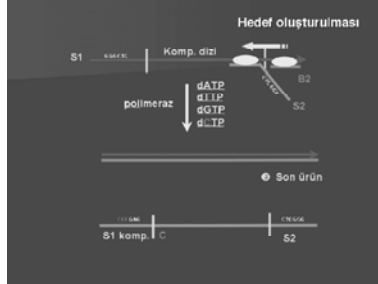
Şekil 1



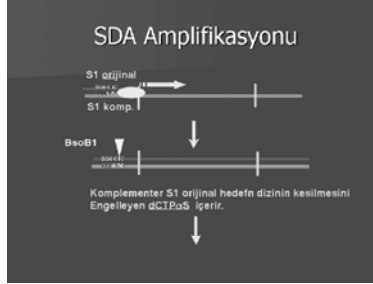
Şekil 2



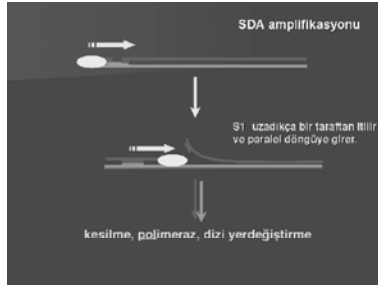
Şekil 3



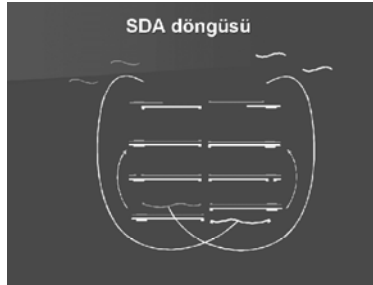
Şekil 4



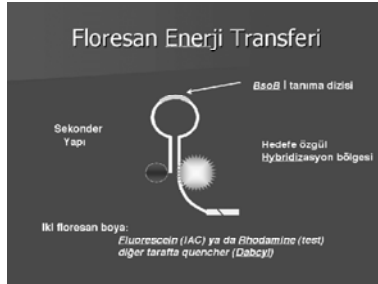
Şekil 5



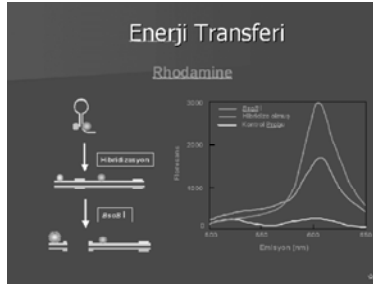
Şekil 6



Şekil 7



Şekil 8



Şekil 9



Şekil 10



BD ProbeTEC ET Genel Özellikler

1. SDA (Dizi yer değiştirme reaksiyonu) tekniği ile çalışır.
2. Amplifikasyon, İzotermal (tek ısıda çoğaltma) olarak gerçekleşir.
3. Amplifikasyon ve floresan saptama eş zamanlı olarak 1 saatte gerçekleşir
4. SDA için gerekli bütün primer, prob, enzim gibi reaktifler koparılabılır striplere ait kuyucuklara kaplıdır,
5. Test sırasında ayrıca reaktif eklemeye gerek yoktur. Kitler 96 kuyucukludur.
6. Amplifikasyon aşamasında kuyucukların üzeri bir bant ile kapatılarak kontaminasyon engellenir
7. Tek odada çalışma kolaylığı sağlar
8. Güvenilirdir, internal amplifikasyon kontrolü (IAC) kitin içinde mevcuttur
9. Kitler oda ısısında saklanabilir
10. Yarı otomatize bir system olup cihaz bakımı ve test prosedürü kolaydır
11. Kinetik okuma ile sonuçların yorumu kolaydır.
12. DTB kit prosedürü, balgam bronco alveolar lavaj, broşiyal ve trakeal aspirate gibi solunum örnekleri için test edilmiştir. Diğer numuneler için performansı değerlendirilmemiştir.
13. DTB testi *M.tuberculosis* complex'i diğer *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum*, ve *M.micoti*'den ayıramaz.
14. *M. tuberculosis* complex probe sekansı , IS6110 *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum*, ve *M.micoti* için spesifiktir.
15. Testin optimal performansı için uygun numune alımı ve transportu gerekmektedir.
16. DTB Testi *M.tuberculosis* complex varyantlarını IS6110 insersiyon sekans eksikliği olduğundan saptamaz.
17. DTB testi kalitatif sonuçlar verir. MOTA değerleri ile pozitif numunedeki hücre sayısı arasında korelasyon yoktur.

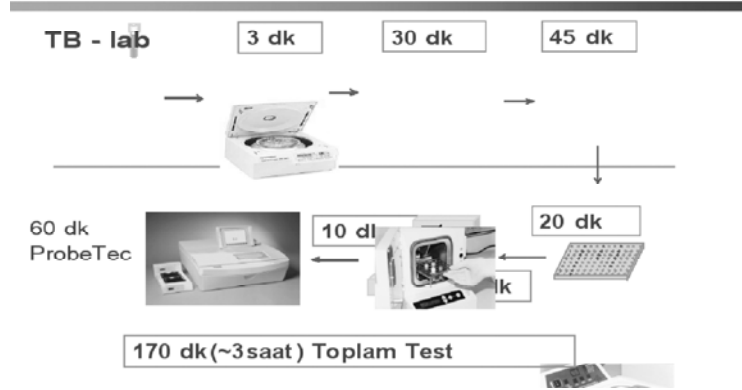
DİKKAT EDİLMESİ GEREKLİ HUSUSLAR

1. Test performansı , solunum örnekleri dışındaki diğer numunelerden (Kan, BOS, gaita, ve idrar için) *M. tuberculosis complex*'ın saptanmasına yönelik değerlendirme yapılmamıştır.
2. Priming kuyucuklarında insan Plasental DNA'sı kullanıldığından reaktifler infeksiyöz olarak değerlendirilmelidir.

3. Isı inaktivasyonu işlemine kadar numune işlemleri Class II Biyolojik Emniyet Kabininde yürütülmeli, bu peryoda kadar olan santrifüj işlemleri aerosol koruyuculu rotor kullanılarak yapılmalıdır. Aerosol koruyuculu rotor güvenlik kabininde açılmalıdır. Standart rotor ısı ile inaktivasyon işleminden sonra kullanılmalıdır.
4. Örnekler CDC önerileri dikkate alınarak NALC-NaOH metodu ile dekontamine edilmeli veya alternative olarak aynı içerikli hazır dekontaminasyon kitleri (Ör: BBL Mycopreb kiti) kullanılmalıdır.
5. Örnekler hemen çalışılmayacaksa NACL/NaOH sedimentleri 2-8 C'ta 5 güne kadar bekletilebilir. 5 günden daha uzun süre çalışılmayacaksa 3 ay'a kadar -20 C veya daha soğukta dondurularak bekletilebilir. Dondurulmuş örnekler, çalışmadan önce oda ısısına getirilerek çözülmelidir.
6. Tüm numuneler, MOTT yönünden de araştırılmalı ve Antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması amacıyla kültürleri yapılmalıdır.
7. Numunelerde HIV veya Hepatit B gibi patojenik infeksiyonlar mevcut olabileceğinden numuneler enfeksiyöz olarak kabul edilerek gerekli laboratuvar prosedürleri, uluslararası öneriler takip edilmelidir.
8. DTB Wash Buffer 1 ve DTB Nötralizasyon Buffer 3 dimetilsulfoksit içerir. Dimetil sulfoksit bulunduğu veya cilt ile temasta yüksek toksiktir. Göze sıçraması halinde bol su ile yıkama yapılmalıdır. Kontamine kıyafetleri hemen üzerinizden çıkartın ve cildinizi su ve sabunla yıkayın.
9. DTB Wash Buffer1 ve DTB Lysis Buffer yüksek alkalidir. Cilt ,göz ve mukoz membran ile kontak edilemesinden sakınılmalı. Kontak edilmesi durumunda derhal bol su ile yıkama yapılmalıdır . Yıkama yapılmadığı durumlarda yanıklar oluşabilir.
10. Pipet uçlarını, numune tüplerini, Priming kapaklarını atarken uygun laboratuvar prosedürlerini uygulayın.
11. Özel santrifüjleme önerileri uygulanmalıdır, uygunsuz santrifüjleme yalancı negatifliğe sebep olabilir.
12. DTB testi antibiyotik tedavisi için kültür yönteminin yerini tutamaz.
13. Pirimer ve Amplifikasyon Mikrokuyucuk poşetleri kullanımdan sonra dikkatlice yapıştırılmalıdır. İçerisinde nem tutucu pedlerin olduğundan emin olunmalıdır

BD ProbeTEC ET *M. tuberculosis* Complex DIREKT TB ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

Şekil 11



I-ÖRNEK HAZIRLAMA PROSEDÜRÜ (Şekil12)

A.ÖRNEK HAZIRLAMA (BİYOEMNİYET KABİNİ DIŞI İŞLEMLER)

- Tüm buffer'lar oda ısısında tutulmalı ve kullanım öncesi iyice karıştırılmalıdır. Stok buffer solusyonlarından örnekler aşağıdaki gibi hazırlanır;
 - DTB Wash Buffer-1:** Her NALC-NaOH sedimenti için kaba 1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 1-2 ml ekstra ilave edilir.
 - DTB Lysis Buffer-2:** Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.1 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1 ml ekstra ilave edilir.
 - DTB Nötralizasyon Buffer-3:** Her NALC-NaOH sediment ve kontroller için kaba 0.6 ml aktarılır. Ayrıca pipetleme hatası göz önüne alınarak 0.5-1.0 ml ekstra ilave edilir.
- Daha sonra artan bufferlar stok solusyonların içerisine konmaz atılır .
- Çalışılacak her hastaya ait NALC-NaOH sediment için 2 ml'lik örnek tüpleri hazırlanır ve üzerleri örnek numarası ile etiketlenir.
- Tüplerin kapakları açılarak her tüpe 1ml DTB Wash Buffer-1eklenir ve tüplerin kapağı kapatılır.
- Hasta örneklerine ait **DTB Wash Buffer-1** ilave edilmiş tüpler biyoemniyet kabinine (BSC) bırakılır.

B. İŞLENMİŞ HASTA NUMUNELERİNDEN YAPILAN İŞLEMLER

(BİYOEMNİYET KABİN İÇİ İŞLEMLER)

Kontamine örnekleri dökmek için kabin içinde infekte sıvı atık kabı bulundurulur.

- a) Falkon tüplerindeki NALC-NaOH sedimentleri 5 sn vortexlenir
- b) Filtreli pipet ucu kullanarak sedimentlerden 500 µL alınıp içerisinde **1 ml DTB Wash Buffer-1** içeren tüpe eklenerek tüpün kapağı kapatılır.
- c) Buraya kadarki işlemler her hasta numunesi için uygulanır.
- d) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR
- e) Her tüp 5sn. Vortexlenir
- f) Tüpleri aerosol koruyuculu rotora yerleştirilip rotor kapağı iyice kapatılarak mikrosantrifujede 12,200 X g 'de 3 dk. çevrilir . Uygun şekilde santrifüj edilmemesi yanlış negatifliğe sebep olabilir.
- g) Santrifüj sonrası süpernatant kabin içerisinde sıvı atık kabına dökülür.
- h) Tüpler, kapakları kapatılarak numune rakına yerleştirilir.
- i) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

C. ÖRNEKLERE ISI UYGULAMA

- a) Tüplerin kapaklarının sıkıca kapalı olduğu kontrol edilir.
- b) Numune rakındaki numuneler fırına yerleştirilir, kapağı kapatılır
- c) RUN #01 seçilir ve OK'e basılır
- d) Uygulamayı başlatmak için "Start" tuşuna basılır, 30 dk. süreyle ısı uygulaması gerçekleştirilir.
- e) Isıtma başladıktan sonra aşağıdaki basamaklar takip edilir
 - Sonikatör hazırlanır (Sonikatör musluk suyu ile su seviyesi dikkate alınarak doldurulur, içerisine banyo rakı yerleştirilir, Isıtıcı 65°C'ye ayarlanır ve ısıtma işlemi başlatılır. Cihaz kapağı kapalı halde iken 60 dk Degas işlemi yapılır.)
 - Santrifüje standart motoru yerleştirilir
- f) 15 dk'lık ısıtmadan sonra, ısıtmanın $\geq 95^{\circ}\text{C}$ 'e ulaşmış olup olmadığını kontrol et.
- g) Fırındaki ısıtma bittiğinde sesli kapıyı açarak numune rakını çıkartılır.

Not: Numune tüplerindeki muhtemel mikobakterilerin artık öldüğü varsayılır. Bu aşamadan sonraki işlemlere kabin dışında devam edilebilir. Ancak numunelere yinede biyolojik tehlikeli madde olarak muamele edilmelidir.

D. ÖRNEK DNA' NIN AÇIĞA ÇIKARILMASI (Lysis)

- a) Isıtma işlemi tamamlanan numune tüpler mikrosantrifüje konur.
- b) Santrifijün kapağı kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.
- c) Santrifüj sonrası tüplerdeki yoğunluk kontrol edilir ve gerekirse işlem tekrarlanır.
- d) Tüpler numune rakına yerleştirilir.
- e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **100 µL DTB Lysis Buffer 2** eklenir.
- f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.
- g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR.
- h) Tüm tüpler 5 sn. vortexlenir ve tüpler numune rakına iyice yerleştirilir. Bununla maksimum düzeyde ultrasonik enerjiye maruziyet sağlanır.
- i) Ultrasonik banyoda su seviyesi ve ısının 65 (+/- 5)°C olup olmadığı dijital termometre ile kontrol edilir.
- j) Tüpler numune rakından Sonik Banyo Rakına yerleştirilir ve kapağı kapatılır.
- k) 45 dk. Süreyle sonikasyon gerçekleştirilir.
- l) Sonikasyon sonunda numune rakı kurutma amacıyla havlu kağıd üstüne konur .

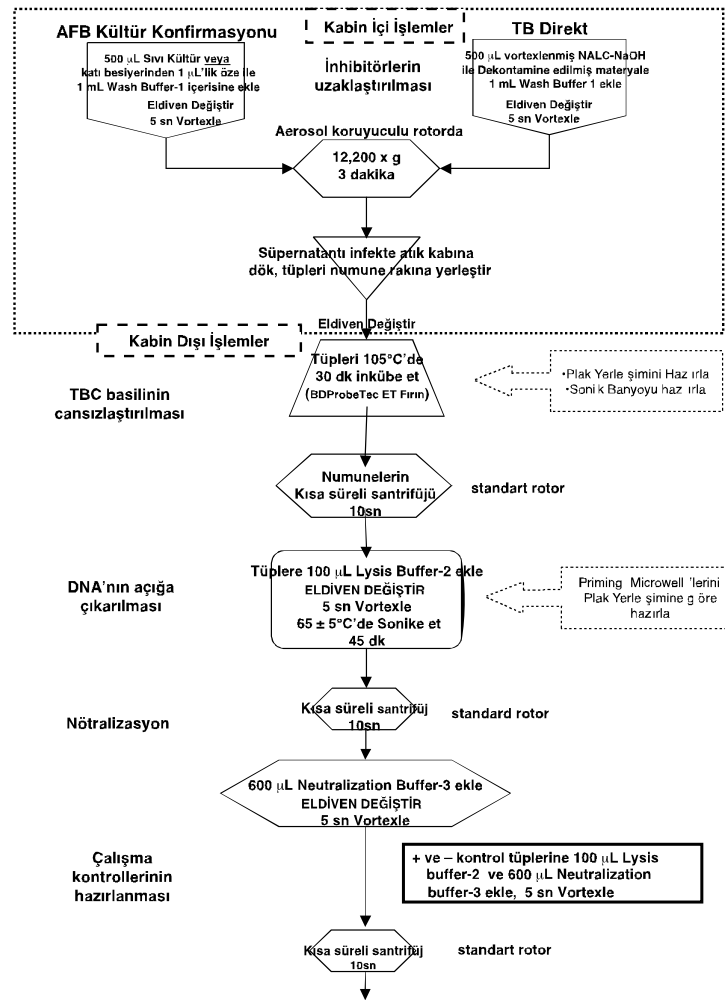
E. NÖTRALİZASYON

- a) Sonike edilmiş numune tüpleri standart rotor yerleştirilmiş mikrosantrifüje konur.
- b) Santrifijün kapağını kapatılır ve kısa süreli (10 sn.) çevrilir.
- c) Santrifüj sonrası yoğunluk kontrol edilir gerekirse santrifüj işlemi tekrarlanır.
- d) Tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.
- e) Filtreli pipet ucu ile her bir tüpe **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.
- f) Her bir numune için ayrı bir pipet ucu kullanılmalıdır.
- g) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR
- h) Her tüp 5 sn. Vortexlenir
- i) Tüpler, tekrar temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

Numuneler artık BDProbeTec ET Sisteminde amplifikasyon için hazırdır. Ancak bu aşamada numuneler opsiyonel olarak bekletilebilir. Bu amaçla;

- 18-33°C'de 12 saate kadar.
- 2 – 8°C'de 4 güne kadar saklanabilir. Çalışmadan önce numuneler için ısıtma aşaması tekrarlanmalıdır.
- -20°C veya daha düşük ısılarda 3 aya kadar dondurulmuş olarak saklanabilir.
- Bu numunelere çalışma öncesi oda ısısında çözündürülerek ve ısıtma aşaması tekrarlanmalı ve 10 sn kadar santrifüj edilerek yoğunluğu kontrol edilmelidir.

Şekil 12 : BDProbeTec™ ET Direkt TB Örnek Hazırlama Prosedürü



II. TEST PROSEDÜRÜ

A. TEST CİHAZLARINI HAZIRLAMA

Test işlemi öncesi sistemle ilgili tüm cihazların çalışma ısıları ayarlanarak durumları stabil hale getirilir.

- Priming heater 72.5°C ve Warming Heater 54°C olmalı
- BDProbeTec ET cihazı ekranında ısı 47.5-55.0 °C okunmalıdır

B. BDProbeTec ET Pipettor PROGRAMLAMA

- **Program 1** Çalışma örneklerinden 200 µL ul çekilir –Priming kuyucuklarına 150 µL ul dağıtılır.
- **Program 5** Priming kuyucuklarından 100 µL çekilir – Amplifikasyon kuyucuklarına 100 µL dağıtılır, 50µL ile 3 kez karıştırılır

C. BDProbeTec ET CİHAZINA ÖRNEK YÜKLEME DÜZENİNİ PLANLAMA

Hasta örneklerine ait bilgi girişi, kit ve kontrol lot numaraları sisteme girilir. Priming ve Amplifikasyon kuyucuklarının ayırımı ve örnekleme için koparılabılır striplerin yerleşimi ayrı ayrı düzenlenir.

D. ÇALIŞMA KONTROLLERİNİN HAZIRLANMASI

- DTB Lysis Buffer 2 ve DTB Nötralizasyon Buffer 3 kullanım öncesi oda ısısında bekletilir ve iyice karıştırılır.
- Her çalışmaya bir **DTB Negatif** ve bir **DTB Pozitif Kontrol** tüpü ilave edilir. Bu tüplerin her birine yeni bir pipet ucu ile **100 µL DTB Lysis Buffer 2** ve **600 µL DTB Nötralizasyon Buffer 3** eklenir.
- Tüpler 5sn vortexlenir .
- Vortekslemeyi takiben mikrosantrifüjde 10 sn santrifüj edilir ve tüpler temiz pipetleme rakına yerleştirilir.

E. TEST PROSEDÜRÜ (Şekil : 13-19)

a) Kontrol ve numune tüp kapakları açılır.

b) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

c) Plate yerleşim planına göre Priming kuyucukları hazırlanır,

d) Pipet programı seçilir (DTB Pipet Prog 1), pipetörün uç aralıkları ayarlanır

e) Numune ve kontrol tüplerinden 200 µl çekilir.

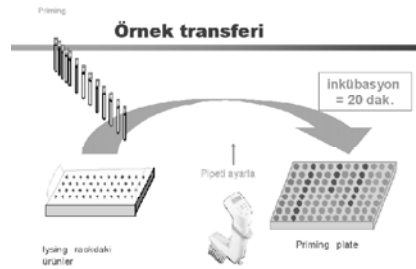
f) Pipet aralığı kapatılır ve Priming kuyucuklarına 150 µL numune aktarılır (Aktarma yapılırken kuyucukların duvarına doğru bırakmak kross kontaminasyonun önlenmesi için önemlidir).

g) Pipet uçları atılır ve numune tüpleri yeni kapaklarla kapatılarak kaldırılır.

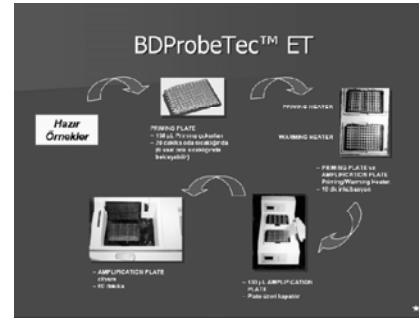
h) Priming kuyucuklarının üzeri plastik kapağı ile kapatılarak 20 dk oda ısısında inkübasyona bırakılır (Bu süre 6 saate kadar uzatılabilir)

i) ELDİVEN DEĞİŞTİRİLİR

Şekil 13



Şekil 14



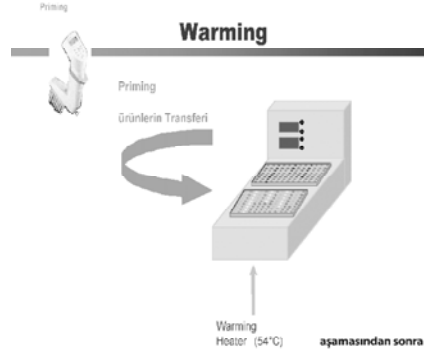
a) İnkübasyon süresinin sonuna doğru Priming kuyucuklarının hazırlanışına benzer şekilde Amplifikasyon kuyucukları hazırlanır

b) Süre sonunda Priming kuyucukları üzerindeki plastik kapak çıkartılır ve Priming Isıtıcısına (72C) konulur. Buna paralel olarak aynı zaman dilimi içerisinde hazırlanan Amplifikasyon kuyucuklarında Amplifikasyon ısıtıcısına yerleştirilir (54 C). 10 dk. (+ / - 1 dk.) beklenir. Bu aşamada süre oldukça kritiktir.

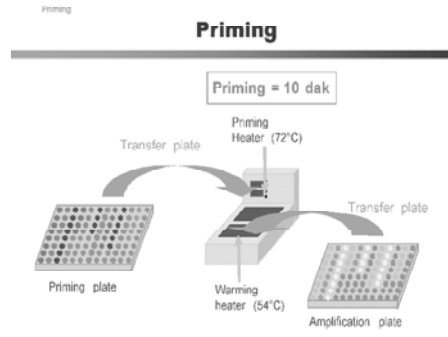
c) İnkübasyon sırasında Pipetörde "DTB Pipet Prog 5" seçilir. Süre bitiminde Priming kuyucuklarından 100 µL alınıp Amplifikasyon kuyucuklarına aktarılır ve hava kabarcığı oluşturmadan pipet programının 50 µL 'lik hacmi ile üç kez karıştırılır.

d) İşlem tamamlandığında Amplifikasyon kuyucuklarının üzeri yapışkan bir kart ile tüm test kuyucukları tamamen kapatılır. Yapışkanlı kapak plağın dışına çıkmamalıdır (aksi takdirde cihazdaki okumalarda hata çıkabilir)

Şekil 15



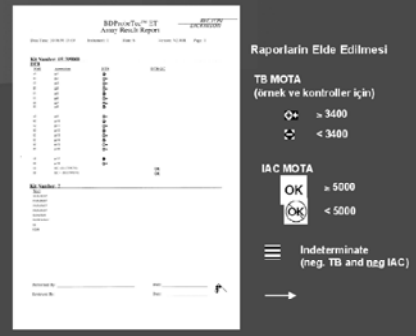
Şekil 16



- Amplifikasyon kuyucuklarını taşıyan plak 30 sn içinde **BDProbeTec ET cihazına** yerleştirilir ve cihaz çalıştırılır. (Şekil 17)
- Çalışma tamamlandığında rapor otomatik olarak cihazın yazıcısından alınır (Şekil 18)
- Cihazdan işlemi tamamlanmış plak dışarı çıkartılır. Kuyucukların yapıştırıcısı açılmadan metal plaktan çıkartılarak atık poşetine konur. Poşetin ağzı kapatılarak atık kabına bırakılır.
- Metal Plak %1 sodyum hipoklorit ile temizlenir distille veya deiyonize su ile silinir ve temiz bir kağıt havlu ile kurutulur.

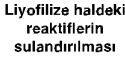


Şekil :17
BDProbeTec ET amplifikasyon ve
detection cihazı



Şekil 18:
Çalışma Raporu ve Yorumu

Şekil 19: BDProbeTec™ ET Direkt TB Test Prosedürü



F. DEĞERLENDİRME

Cihazın verdiği MOTA (Method Other Than Acceleration) skoru; Reaksiyon sonunda oluşan sinyalin değerlendirilmesinde ve ölçülmesinde kullanılır (Tablo 1). Bu değerler;

- İlk dakikadaki background okumasından çıkartılarak elde edilir.
- Bu değer eğimin altında kalan alanı tanımlar
- Test tamamen kalitatifdir; amplifikasyon numuneden numuneye değişiklik gösterebilir, MOTA değeri ile numundeki hedef miktarı arasında bir bağlantı yoktur.

Tablo : 1 Beklenen Cut-off MOTA değerleri

Örneğin MOTA Değeri	IAC MOTA Değeri	Açıklama
> 3.400	Bakılmaksızın	Pozitif
<3.400	>5.000	Negatif
<3.400	<5.000	Testin tekrar edilmesi gerekli

G. KALİTE KONTROL

Her çalışma için ve farklı kit lot numarası için 1 Pozitif ve 1 Negatif Kontrol birlikte çalışmalıdır. DTB Pozitif kontrolü reaktif hatalarını, pipetleme ve inkübasyon gibi çalışma prosedür hatalarını denetler. DTB Negatif kontrolü ise reaktif ve dış çevre kontaminasyonlarını denetler. Numunelerin raporlanması için Negatif kontrol negatif, Pozitif kontrol pozitif olarak sonuçlanmalıdır. Kontroller beklendiği gibi sonuçlanmaz ise sonuçlar değerlendirilemez ve rapor edilemez. Bu durumda tüm çalışma yeni kontroller, kuyucuklar ve işlenmiş numuneler ile tekrar edilmelidir.

Internal Amplifikasyon Kontrolü (IAC) Priming kuyucuklarının içinde bulunmaktadır. IAC, Amplifikasyonu, reaksiyonu ve örnekteki potansiyel inhibisyonun varlığını denetler.

Çalışmada örnek hazırlamadaki etkinliği test etmek amacıyla her laboratuvar kural olarak *M.tuberculosis* H37Ra ATCC kontrol suşuna ait 1 Mc Farland yoğunluktaki bir süspansiyonu prosedür kontrolü olarak rutin çalışmalara dahil etmelidir.

KAYNAKLAR

1. Alp A.: Mikobakterilerin tanı ve identifikasyonunda moleküler yöntemler.
- 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve Bildiri Özet Kitabı, Ankara, Sayfa: 95-99, 2004
2. Barret A, Magee J.G , Freeman R .: An evalution of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Oct; 51(10):895-98
3. Bemer MP, Germaud P, Drugeon HB. : *Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis*

by a commercial polymerase chain reaction kit. *Pathol Biol (Paris)* 1998 Oct ; 46 (8):597-603

4. Bergmann J.S, Keating W.E, Woods G.L.: Clinical evaluation of the BD ProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* (2000) Feb; 38(2):863-65

5. 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

6. Gerdes R.: Evaluation of BD Probe Tec ET System for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical respiratory specimens using Strand Displacement Amplification technology. Abstr.U-68 , ESM 2000

7. 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

8. 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

9. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Bornigia S.: Performans assesment of two commercial amplification assays for Direct Detection for *Mycobacterium tuberculosis* Complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Nov; 40(11):4138-42

10. Scarparo C, Picolli P,Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C.: Direct identification of mycobacteria from MB/BacTalert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* (2001) Sep; 39(9): 3222-27

11. Schmidt E., Feldman K.: Clinical evaluation of BD Probe Tec ET System for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Clinical respiratory specimens.Abstr.M004, ESM 2000

12. Wang S.X, Sng LH., Tay L.: Preliminary study on rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by the BD Probe Tec ET system. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53; 57-59

13. Woods GL.The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am.* 2002 Mar;16(1):127-44

14. Woods GL.: Molecular Techniques in Mycobacterial Detection. *Arch Pathol Lab Med.*2001; 125: 122-126

NOTLAR

[illegible]

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

NOTLAR

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.