

TÜBERKÜLOZ TANISINDA PCR

Doç. Dr. Cafer EROĞLU

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi

Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

Moleküler biyolojik çalışmaların temeli Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA molekül yapısını tanımlamalarına dayanmaktadır. DNA yapısı tanımlandıktan sonra ilerlemeler baş döndürücü bir hızla gelişmiştir. Ters transkriptaz (RNA'dan complementary DNA yapımı) enzimlerinin tanımlanması, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin keşfi, klonlama teknolojisinin gelişmesi, DNA dizi analizinin başarılmaması, DNA problemleri ve Polymerase Chain Reaction (PCR) gibi nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi hızlı bir şekilde bir biri ardına ortaya konmuştur (1). PCR özellikle diğer moleküler yöntemlerden farklı olarak taşıdığı potansiyel nedeniyle daha yaygın kullanım alanı bularak hemen hemen her moleküler laboratuvara girmiştir.

Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan, zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu yöntemlerin tanı amacıyla bir başka kullanım alanı, hastaneye gelmeden önce tedavi

başlandığı için kültürde üretilmeyen mikroorganizmaların saptanmasıdır.

Mycobacterium'lar tarih boyunca olduğu gibi günümüzde de salgınlara yol açmakta, yeni epidemiyolojik tipler veya ilaçlara dirençli mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüberkülozun kontrolü için erken teşhis esastır. Günümüzde tüberküloz tanısında en kolay ve hızlı metot aside dirençli basillerin Erlich Ziehl Neelsen (EZN) boyasıyla gösterilmesidir. Bununla beraber boyama ve yayma mikroskopisi için ml'de 5000-10000 bakteri gerekmektedir. Tedavi edilmemiş hastalarda yapılan çeşitli çalışmalarda tüberküloz hastalarının % 50-80'inde yayma pozitifliği gösterilebilmiştir (2). Günümüzde hala altın standart kültürdür. Kültür balgam, bronş lavajından başka beyin omurilik sıvısı ve idrar gibi solunum sistemi dışı örneklerde de rahatlıkla kullanılabilir. Kültür aynı şekilde yaklaşık yaymadan 500 kez daha duyarlıdır ve duyarlılık saptanması gibi daha ileri araştırmalar için bakteriyi de sağlar. Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri mycobacterium'lara bağlı

infeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumakla birlikte daha uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle mycobacterium infeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur (3).

Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı, şu ana başlıklar altında toplanabilir:

1. Mycobacterium'ların klinik örneklerde varlığının saptanması.
2. Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi.
3. Mycobacterium'ların antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması.
4. Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile Mycobacterium infeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılması.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR ilk defa Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmıştır (1). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur. İlk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95 °C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır (denatürasyon). İkinci basamak bağlanmadır (yapışma = annealing).

Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = extension). Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ sayısına ulaşır. Hedef sayısı, enzim, dNTP, primer konsantrasyonu ve çoğaltılan bölgenin birikmesi gibi nedenlerle ürün miktarı formüldeki sayıya ulaşmaz. Fakat yinede milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır (4,5).

PCR'ın ticari olarak ilk defa Roche firması tarafından kullanılmıştır. Roche firmasının Amplicor sisteminde tüberküloz tanısında mümkündür.

PCR'ın farklı firmalar tarafından kullanılmasının ve geliştirilmesinin lisans ile

sınırlanması nedeniyle diğer firmalar tarafından alternatif amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Transcription mediated amplification (TMA) retroviral replikasyona benzer şekilde PCR'dan farklı olarak RNA'yı hedef alır. TMA izotermaldir ve thermal cycler cihazı gerektirmez. Bu metot tüberküloz teşhisinde kullanılmak üzere Gen-Probe firmasında mevcuttur.

Strand displacement amplification (SDA) amplikonun tek zincirli kopyalarının çoğaltılmasına dayanır ve izotermaldir. Bu metodu kullanan sistem Backton-Dickenson firması tarafından sağlanabilir.

Ligase chain reaction (LCR) Abbott firması tarafından geliştirilmiştir. LCR PCR'ye benzer şekilde sikluslar kullanır. LCR hedef DNA'ya özgü problemlerin birleştirilebilmesi için termostabil ligaz enzimini kullanır. Bu işlemin sikluslar şeklinde tekrarlanmasıyla her siklуста yeni hedef DNA'lar elde edilmiş olur.

PCR ve bu yeni amplifikasyon tekniklerinin rutin uygulamalardaki değeri (teşhis için gereken sürenin kısalması) bir çok çalışmada gösterilmiştir (6,8)

PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar

PCR'deki sorunların ana nedeni testin yüksek duyarlılığı; ideal şartlarda bir tek genomu (bakteri veya virüs,...vb.) dahi tespit edebilmesine dayanmaktadır. Hassas çalışma metotları ile dahi PCR

laboratuvarında karşılaşılan sorunlar aşılamamıştır. Daha güvenilir, standart, uygulaması kolay, az emek ve maliyet gerektiren tekniklere rutin uygulamada büyük ihtiyaç vardır (1,3).

En sık karşılaşılan Sorunlar Aşağıda Sıralanmıştır.

1. Yalancı pozitif ve negatiflik
2. Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme
3. Uzun süre ve iş yoğunluğu
4. Özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirme
5. Sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması
6. Standardizasyon gerekliliği
7. Maliyet

Bu sorunların çözümü veya en aza indirilebilmesi için örnek alımından PCR'nin son aşamasına kadar bir dizi uyarı ve önlemlere sıkı bir şekilde uyulmalıdır.

Örnek Alma, Taşıma ve İşleme

PCR için vücut sıvı (serum, vb.) ve sekresyonları veya dokular gibi her türlü materyal bir örnek olabilir. Fakat hemoglobin ve heparin gibi inhibitörlerden mümkün olduğu kadar kaçınılmalıdır. PCR için en uygun örnekler; etkenin yoğun bulunduğu, elde edilmesi kolay, en az kompleks ve yeterli miktarda elde edilebilen örneklerdir. Örnek usulüne uygun olarak alındıktan sonra; uygun örnek kabına (mümkünse RNase ve DNase bulunmayan) konularak taşınmalı ve saklanmalıdır. Bazı örneklerle gerekirse

dekontaminasyon ve homojenizasyon işlemleri uygulanabilir.

Nükleik Asitlerin İzolasyonu

Bir örneğin PCR işleminde kullanılabilmesi için DNA veya RNA'nın izole edilmesi yani diğer maddelerden ayrılarak saflaştırılması (pürifikasyon) gerekir. Bu işlemde izole edilecek hedefe (DNA veya RNA) uygun metot kullanılmalıdır. Hedef RNA ise RNase inhibitörü ve RNase bulunmayan su, tamponlar ve sarf malzemeleri kullanılmalıdır. Bu aşamada örnekten (idrar, balgam ve hemoglobin,.. vb.) veya metottan kaynaklanan inhibitörler (fenol, SDS) elimine edilmelidir. Basit, etkili, hızlı ve güvenilir metotlar tercih edilmelidir. Yüksek ısı (kaynatma metodu) veya pH yapılacağı oda). Eğer imkanlar yetersiz ise 3 oda da yeterli olabilir. Termal Cycler; hızlı, kapaktan da ısıtmalı, elektrik kesildiğinde kaldığı siklustan tekrar başlayabilen, 0.2 ml ve 0.5 ml'lik blokları değiştirilebilen aletler tercih edilmelidir. Reaktifler, diğer tampon sıvıları ve PCR karışımı mümkünse klas I laminar kabinde hazırlanmalıdır. Örneklerden DNA izole edilirken klas II laminar kabin tercih edilir. Kabin yoksa hava sirkülasyonu olmayan sadece bir yüzü açık camekanlı bölmeler kullanılabilir.

Optimizasyon

In house (ev yapımı) PCR yapıldığında; izole edilen hedef DNA miktarı, primer

(alkali lizis metodu) özgüllüğü ve DNA kalitesini azaltabilir. Kullanılan malzemeler (pipet, nükleaz bulunmayan tüp ve filtreli uç) kaliteli olmalıdır. Primer, prob ve nükleotitler mümkünse High Pressure Liquid Chromatography ile pürifiye edilmiş olmalıdır. Kaliteli enzimler (taq polimeraz) mümkünse oda ısısında inaktif olan ve ısıtıldığında aktifleşen modifiye taq polimerazlar kullanılmalıdır.

Alet ve Alt Yapı

PCR uygulaması yapılacak alan mümkünse fiziksel olarak birbirinden ayrılmış dört odaya ayrılmalıdır. 1. Reagent hazırlama odası, 2. Ekstraksiyon odası, 3. Nestet PCR yapılacaksa 2. PCR'nin pipetajının yapılacağı oda ve 4. Kirli oda (agaroz jel elektroforezinin konsantrasyonları, Mg^{+} miktarı, taq polimeraz miktarı, uygulanacak siklus sayısı, denatürasyon, bağlanma, sentez süre ve sıcaklıkları belirlenmeli ve testin duyarlılık alt sınırı kopya sayısı bilinen standart örnekler kullanılarak saptanmalıdır.

Görüntüleme Aşamasında Karşılaşılan Sorunlar

Agaroz jelde bant görülmemesi; etidyum bromid katılmamasına, UV lambasının zayıflığına veya spesifik ürünün yokluğuna bağlı olabilir. Bu nedenle her PCR uygulamasında sistemin çalıştığının gösterilmesi için mutlaka pozitif kontrol bulunmalıdır.

Bantlar bozuk ise ürün fazlalığı olabilir, agaroz jel iyi dökülmemiştir veya elektrik şiddeti fazla uygulanmıştır.

Bantlar zayıf görülüyor ise; ürün veya etidyum bromid azdır, elektrik şiddeti fazladır.

Fazla sayıda bant veya semear oluşumu; PCR optimize değil, agaroz jel ve elektrik şiddeti uygun değil.

sistemi içerdikleri için carry over kontaminasyon problemi en aza inmiştir. Bazılarında Real-Time (her an izlenebilen) olarak PCR ürününün artışı izlenebilir. Bu sistemlerde aynı anda kalitatif ve kantitatif değer elde edilebilmektedir. Ayrıca bu sistemler özel prob dizaynı ile mutasyonların belirlenmesi içinde kullanılabilir. Sistemine göre DNA izolasyonu dahil PCR 90-180 dakikada tamamlanabilmektedir. Alet maliyet katılmazsa test maliyeti klasik PCR ile aynıdır. Ayrıca yeni sistemler daha az floresan boya kullandıkları için çevreyi daha az kirletmektedirler. Yeni sistemlerin dezavantajı ise çoğunlukla cihaz ve sarf malzemesi bağımlı olmaları ve henüz tam standardize edilememeleridir. Real-Time PCR tekniklerinden ülkemizde olanlar; Perkin Elmer'ın Sequence Detection System (5700, 7000, 7700)'i, Roche Diagnostics'in Lightcycler sistemi, Biorad'ın Icycter sistemidir. Bu sistemlerin hepsinde bir floresan boya olan SYBR Green I'nin nükleik asitlere bağlanmasına dayanan SYBR Green I teknolojisi kullanılabilir. SYBR Green'e ek olarak Lightcycler'da floresans rezonans energy transfer (FRET) teknolojisi, Sequence Detection

Sorunlara Çözüm Olabilecek Yeni Teknikler

PCR da yaşanan sorunların çözümü için Real-Time PCR teknikleri bir alternatif olabilir. Yeni teknikler kapalı tüp veya kapiller

System'inde ve Icycter'da Taqman teknolojisi kullanılabilmektedir (9).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriksiyon enzimlerinin (RE) keşfi moleküler metotların gelişimini dahada hızlandırmıştır. RE'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizelerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. RE'leri bakterilerin kendilerini yabancı DNA'laradn korumasını sağlayan enzimlerdir. 1978 yılında RE'lerini ilk tanımlayan Aber W, Smith H ve Nathans D nobel ödülü kazanmışlardır. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi ve rakamda tanımlandıkça 1, 2 ve 3 gibi numarayı ifade eder. Örneğin PvuI enzimi Proteus vulgaris'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RE'lerinin DNA analizinde kullanılması ile ayırım gücü oldukça yüksek bir teknik olan RFLP yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin temeli tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre

ayrıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilmesine dayanır. Bu yöntem oldukça spesifiktir ve komple DNA analizlerine alternatif olabilir (3). Genomik DNA'nın RE'leri ile kesilmesinde oldukça uzun ve değerlendirmesi zor olan bu yöntem PCR sonrası uygulamalarda nispeten daha kolay ve kısa sürede uygulanabilir (10). Bu yöntemin avantajı çok az DNA ile çalışılması, kısa sürede sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Yöntemin dezavantajları ise genomda ortaya çıkan doğal mutasyonların kesim bölgelerinin değiştirebilmesi ve bazen kısmi kesimlerin olmasıdır. RE'leri genellikle 10 ünite/ml konsantrasyonunda ve % 50 gliserollü tamponda – 20 °C'de tutulur. Enzimler oldukça pahalı olduğu için steril ortamlarda çalışılmalı ve enzimle çalışılırken buz

üzerinde tutulmalıdır. Her enzimin optimum tamponu üretici firma tarafından enzimle birlikte verilmektedir. PCR ürünü, enzim ve tamponu uygun konsantrasyonda karıştırıldıktan sonra enzime uygun sıcaklıkta belirli bir süre (enzime göre değişir) tutulmalıdır. Sonra ise kesilen ürün agaroz jelde yürütülebilir. Günümüzde RFLP tekniği insan genetik çalışmaları (allelerin ayrımı vb.) başta olmak üzere birçok genetik çalışmada kullanılmakta ve her geçen gün yeni Re'leri keşfedilmektedir (3).