

MOLEKÜLER TANIDA TİCARİ SİSTEMLER UYGULAMALI KURS NOTLARI

Mycobacterium tuberculosis Direk Test
(MTD; Gen-Probe, San Diego California)

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Haydarpaşa, İstanbul

MTD, amplifiye örnekten doğrudan *M.tuberculosis*'i tanımlayan bir sistemdir. Bu sistemde, Transkripsiyon esasına dayalı amplifikasyon (TMA) ve Gen-Probe Hibridizasyon Protection Assay (HPA) tekniği birleştirilmiş olup amplifikasyon ve arama iki aşamalı olarak ard arda gerçekleşir. Hedef, mikobakterinin rRNA'sı olup test süresi yaklaşık 3.5 saattir.

Hazırlanan örneklerden sonikas-yonla elde edilen mikobakteri hedef nükleik asidi (16S rRNA) izotermal olarak TMA yöntemi ile 42°C'de tek bir tüpte amplifiye edilir. Ribozomal RNA her mikobakteri hücrelerinde yaklaşık 2000 kopya olarak bulunur. Bu yöntemde kendi kendine devam eden bir dizi kopyalama işlemi olur. Oluşan ampikonlar HPA aşamasında akrinyum esterle işaretli DNA problemleri ile birleşerek kararlı RNA:DNA hibritleri oluşturur. İşaretli RNA:DNA hibritleri luminometrede Bağlı Işık Birimi (Relative Light Unit-RLU) cinsinden ölçülür (Şekil-1).

İnhibitör varlığını araştırmak için sistemde internal amplifikasyon kontrol bulunmamaktadır. MTD için inhibitör testi, kuşku durumlarında veya gerektiğinde ekstrakte edilmiş balgamin içerisine yaklaşık 10-100 MTBC basili konularak test tekrarı yapılır. Negatif sonuç inhibitör varlığını gösterir.

MTD Çalışma Prensipleri:

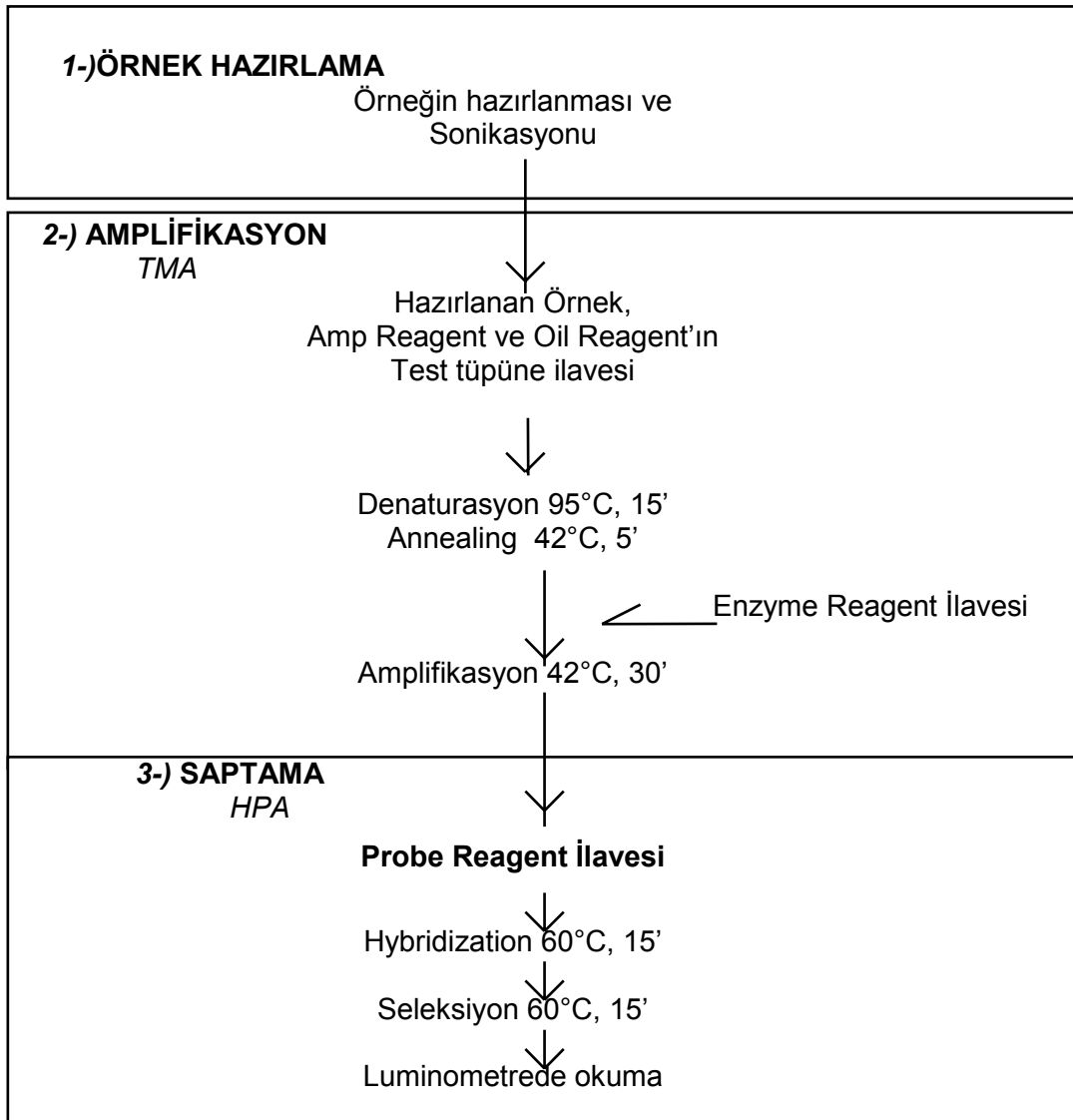
MTD test işleminde, TMA için iki primer ve iki enzim kullanılır. Bunlar; **Reverse transkriptaz (RT) ve RNA Polimeraz'dır.** Önce RT etkisiyle RNA'nın DNA kopyası çıkarılır. Bu sırada reaksiyon sırasında kullanılan ve 16S rRNA hedef dizisi ile hemen hemen komplementer olan birinci primerin 5' ucunda bulunan bir promotor dizi, elde edilen ürünün içerisine yerleştirilmiş olur. Daha sonra RT'nin RNAz-H aktivitesiyle RNA-DNA dubleksindeki RNA ortadan kaldırılır. Kalan tek zincirli DNA, cDNA'nın bir parçası ile komplementer olan

ortamdaki ikinci primerin 5' ucundan başlayarak RT'nin DNA polimeraz aktivitesiyle çift zincirli DNA haline gelir. Sonra ortamdaki RNA polimeraz, promotor diziden başlamak üzere çift zincirli DNA'dan çok sayıda tek zincirli RNA kopyası yapar. Bu RNA zincirlerinin bir kısmını RT kalıp olarak

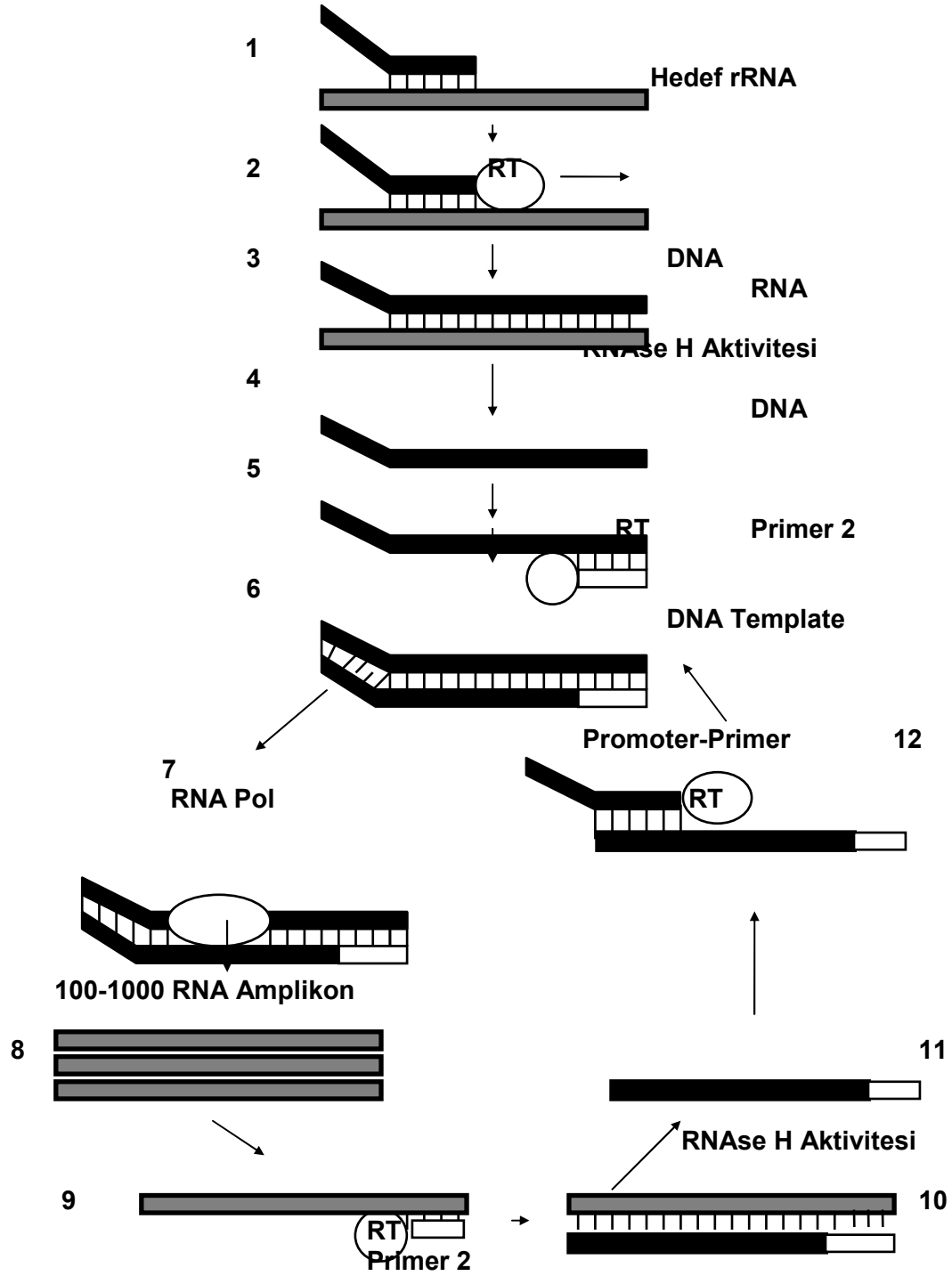
kullanır ve tekrar DNA yapımı ile reaksiyon zincirleme tarzında devam eder (Şekil-2).

Çoğaltılan rRNA dizisi (amplikonlar) HPA yönteminde akridinyum esterle (AE) işaretli DNA problemleriyle hibridize edilerek luminometrede Bağlı Işık Birimi (*Relative Light Unit-RLU*) cinsinden ölçülür (Şekil -3)

Şekil-1 : Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direkt (MTD) Test Protokolü



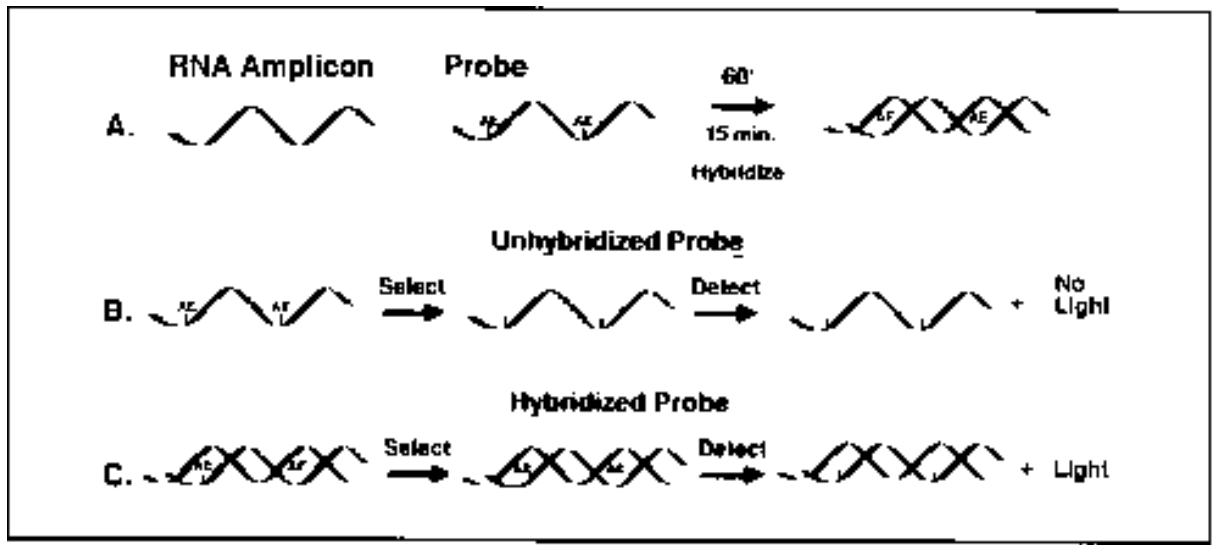
Şekil-2: Transkripsiyon yolu ile Mycobacterium tuberculosis'in saptanması



DNA problemleri ve HPA tekniği ile amplicon tayini, ortama ilave edilen AE ile işaretlenmiş DNA probun TMA ile çoğaltılmış rRNA ampliconlarındaki hedefe özgün olarak bağlanması sonrasında AE'in çift heliks ile korunması ve daha sonra lüminometrede akridinyumun parçalanarak açığa çıkardığı ışığın ölçülmesi esasına dayanır. HPA

teknikinde hibritlenen problemlerin hibritlenmeyenlerden ayrılması, hibritlenmeyen problemlerdeki AE'i hidroliz eden selektif ayırıcıların ortama ilavesi ile gerçekleşir. Luminometrede hibritlenmeyen problemler ışık yaymaz. Hibritlenen problemlerdeki AE ise çift heliks ile korunduğundan selektif ayırıcılarla hidroliz olmaz.

Şekil 3: HPA tekniği



GEN-PROBE MTD TESTİ GENEL ÖZELLİKLERİ:

- Sistem FDA (U. S. Food And Drug Administration) onaylıdır.
- Tanısı pek çok durumda aciliyet gerektiren Mycobacterium tuberculosis klasik kültürde 4-6 hafta içerisinde saptanırken MTD ile yaklaşık 3-3.5 saat içinde sonuç alınabilmektedir.
- MTD Sistemi hem pulmoner hem de ekstra pulmoner örneklerde çalışabilmektedir. Özellikle tüm

vücut sıvılarında başarıyla kullanılabilmesi (*beyin-omurilik sıvısı, idrar , açlık mide suyu*,vs) diğer sistemlerden üstünlük sağlamaktadır.

- MTD Sistemi moleküler biyolojide son yıllarda geliştirilmiş etkili bir yöntem olan transkripsiyon yoluyla amplifikasyon (TMA) ve hibridizasyon koruma tekniği ile (HPA) çalışmaktadır.
- MTD, basile özgül çok sayıda ribozomal RNA (rRNA)'yı hedeflediği için az sayıda basil içeren örneklerde

- bile başarılı sonuçlar sağlayabilmektedir.
- MTD testi, sadece *Mycobacterium tuberculosis* complex üyelerinin saptanmasını sağlar. Bundan dolayı tanıda çoğu kez karışıklığa sebep olan *Mycobacterium tuberculosis* complex dışı bakteriler (*Mycobacterium other than tuberculosis*-MOTT) , MTD testinde sorunlara yol açmaz.
 - MTD Testi, standart laboratuvar cihazlarıyla çalışmakta, özellik arzeden laboratuvar koşulları gerektirmedüğinden her laboratuvar da kolayca uygulanabilmektedir. MTD sisteminin bu kolaylığı diğer moleküler sistemlere göre önemli bir tercih nedeni olabilmektedir.
 - MTD , tüm reaktiflerle tek bir tüpte çalışıldığı için kontaminasyon ve buna bağlı yanlış pozitif sonuç verme riskini en aza indiren çalışma prensibi sayesinde *Mycobacterium tuberculosis* tanısındaki en ciddi problemlerden birini ortadan kaldırmaktadır.
 - Bir kutu MTD test kiti 50 testliktir.

TEST ÖNCESİ VE TEST SIRASINDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKLİ HUSUSLAR

- Örnekler kan içermemelidir.

- Örnekler steril, plastik kaplara alınmalı, laboratuvara hemen ulaştırılmalıdır. Laboratuvara ulaşana dek 2-8°C'de korunmalıdır.
- Dekontaminasyon işlemi örneklerin alınmasını takiben 24 saat içinde yapılmalıdır. Dekontamine edilmiş örnekler çalışılana kadar -20°C'de saklanmalıdır.
- Dekontaminasyon işlemi sonrası örneklerin nötr pH'da olması gerekmektedir.
- MTD testi ile, anti-tüberküloz tedavisi almayan hasta örnekleri ile en fazla 7 gün önce tedaviye başlanmış ya da en az 1 yıldır tedavi görmeyen hasta örnekleri değerlendirilebilir.
- MTD testiyle sadece *M. tuberculosis* complex üyeleri saptanmaktadır.
- Çok miktarda MOTT içeren örnekler zayıf pozitif sonuca yol açabilir.

GENPROBE MTD ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Kit içeriği:

M.tuberculosis amplification tray

1. Mycobacterium Specimen Dilution Buffer (1x 2.5 ml)
2. Mycobacterium tuberculosis Amplification Reagent (liyofilize)
3. Mycobacterium Amplification Buffer (1 x 3 ml)
4. Mycobacterium Oil Reagent (1 x 10 ml)
5. Mycobacterium Enzyme Reagent (liyofilize)

6. Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (1 x 1.5 ml)

M.tuberculosis hybridization tray

7. Mycobacterium tuberculosis Hybridization Reagent (liyofilize)
8. Mycobacterium Hybridization Buffer (1 x 6 ml)
9. Mycobacterium Selection Reagent (1 x 15 ml)
10. Mycobacterium Lysing Tubes (2 x 25 adet)
11. Sealing Cards (1 paket)

Kitle Birlikte Verilmeyen, Çalışma İçin Gerekli Malzemeler

1. Mikropipetler (25µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl ve 450 µl hacimli)
2. Vorteks mixer
3. Steril su (Filtre edilmiş veya otoklavlanmış)
4. Kültür tüpleri
5. Steril 3mm cam boncuklar
6. Mikrosantrifüj tüpleri (burgulu kapaklı)
7. Amplification positive cell kontrol (Ör; *M.tuberculosis* ATCC 25177 veya ATCC 27294)
8. Amplification negative cell kontrol(Ör; *M.gordonae* ATCC 14470, veya *M.terrae* ATCC 15755)
9. Sodyum hipoklorit (Çamaşır suyu; %5.25 hipoklorit solusyonu)
10. Plastik bench üstü tıbbi atık kutusu

Gen-Probe TARAFINDAN TEMİN EDİLEBİLEN, TESTİN ÇALIŞILDIĞI CİHAZ VE MALZEMELER

1. **Gen-Probe Leader** , Luminometre
2. **Gen-Probe**, Sonikatör
3. **Gen-Probe**, Dedection Reagent Kit
4. **Gen-Probe**, Su Banyosu (42°± 1°C Ve 60° ±1°C)
5. **Gen-Probe**, Kuru Isı Ortami * (42°± 1°C ,60° ±1°C ve 95° ±5°C)
6. **Gen-Probe**, Sonikatör Rack
7. Test Tüp Rack'leri
8. 1000 MI Pipet Uçları (Hidrofobik Tıkaçlı)
9. 175 µl'lik pipet uçları (hidrofobik tıkaçlı)
10. 12x75 mm polipropilen tüpler(amplification tüpleri)
11. Mikropipetler (25µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl ve 450 µl hacimli)
12. 12x75 mm polipropilen tüp tıkaçları
13. Repeat pipetörler

*12x75 mm'lik tüplere uygun Gen-probe'un kendi ısı bloklarının kullanımı önerilir.

GENPROBE MTD LABORATUVAR UYGULAMA PROTOKOLÜ

REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

Kit içindeki liyofilize malzemeler sulandırılmadan 2-8°C'de son kullanma tarihlerine kadar stabildir. Kit ilk açıldığında liyofilize olan malzemelerin sulandırımı şu şekilde yapılır:

1.M. tuberculosis Amplification

Reagent: Liyofilize *M. tuberculosis* Amplification Reagent 3.0 ml Mycobacterium Amplification Buffer ile karıştırılarak çözülür. Solusyon iyice karışınca kadar vortekslenir, berraklaşana kadar oda ısısında bekletilir. İlk sulandırmadan sonra eppendorf tüplere bölünür. Hazırlandıktan sonra 2-8°C'de 2 ay stabildir. Kullanım öncesi oda ısısına gelmesi sağlanmalıdır.

2.Mycobacterium Enzym Reagent:

Liyofilize Mycobacterium Enzym Reagent ve Mycobacterium Enzym Dilution Buffer karıştırılır. Eriyene kadar vortekslenir. Enzim sulandırıldıktan sonra en fazla 15 dk oda ısısında bekletilebilir. Eppendorf tüplere bölünür. Hazırlandıktan sonra 2-8°C'de 1 ay, -20°C'de 2 ay stabildir. Dondurulmuş reagent içeren aliquotlar çözüldükleri gün kullanılması gereklidir.

3. M. tuberculosis Hybridization

Reagent: Liyofilize *M. tuberculosis* Hybridization Reagent ve *M. tuberculosis* Hybridization Buffer karıştırılır. Eriyene kadar vortekslenir. Eppendorf tüplere bölünür. Hazırlandıktan sonra 2-8°C'de 1 ay, -20°C'de 2 ay stabildir.

Kullanıma Hazır Olan Reaktifler:

1. Mycobacterium Oil Reagent : 2-8°C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.
2. Mycobacterium Selection Reagent: 2-8°C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.
3. Mycobacterium Specimen Dilution Buffer: 2-8°C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.

TEST UYGULAMA PROSEDÜRÜ

1. Sonikatöre çizgi seviyesine kadar musluk suyu konur. Çalışmaya başlamadan önce optimal sonik enerjinin transferi için sonikatör 15 dakika çalıştırılarak suyun degasse olması sağlanır.
2. Üç ısı bloğu (42± 1°C ,60°C ve 95°C)' da çalıştırılır.
3. Luminometre cihazı açılır, özellikle pompalaması kontrol edilir.
4. Lize tüpleri işaretlenir. Çalışma düzeni şöyle olmalıdır:

Negatif kontrol	Pozitif kontrol	1.Hasta	2.Hasta	3.Hasta	4.Hasta
					

5. Tüp kapakları açılarak tüm mycobacterium lysing tüplerine pipetle 50µl Mycobacterium specimen dilüsyon bufferi ilave edilir.
6. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve vortekslenmiş, dekontamine edilmiş örneklerden 450 µl lize tüplerine aktarılır. Negatif kontrol olarak 450 µl ddH₂O, pozitif kontrol olarak üremiş kültürden hazırlanan 450 µl'lik karışım kullanılır.
7. Tüp kapakları kapatılarak 3 sn vortekslenir ve tüpler sonikatore yerleştirilir. 15 dk sonike edilir. Sonikasyondan sonra örnekler, lizat olarak isimlendirilir. Lizat vortekslenmez
8. Amplifikasyon tüpleri önceki gibi işaretlenir ve 50 µl *M. tuberculosis* Amplification Reagent pipetlenir.
9. Üzerlerine 200 µl Oil reagent tüp duvarından sızdırılarak konur.
10. Amplifikasyon tüplerinin dip kısımlarına yağ tabakasını geçerek 25 µl lizat eklenir
11. Tüpler sealing kartla kapatılarak 95°C'de 15 dk inkübe edilir. Bu süre 20 dk'yı geçmemelidir. Bu süre içerisinde enzim sulandırılmamışsa sulandırılır, altüst edilerek karıştırılır ve berraklaşması beklenir. Daha önceden sulandırılmışsa -20°C'den çıkartılıp oda sıcaklığında erimesi beklenir. Ancak enzim oda sıcaklığında 15 dk'dan fazla kalmamalıdır.
12. Tüpler süre bitiminde 95°C'den çıkartılır ve hemen 42°C'ye alınır. 42°C'de 5 dk bekletilir. 5 dk sonunda 25 µl enzim eklenir ve karıştırılır. 30 dk 42°C'de inkübe edilir. Bu süre içerisinde Mycobacterium Hybridization Reagent hazırlanır ya da daha önceden hazırlanmışsa -20°C'den çıkartılıp oda ısısına gelmesi beklenir.
13. Süre bitiminde tüpler 42°C'den oda ısısına alınır ve 100 µl Mycobacterium Hybridization Reagent eklenir
14. Tüpler 3 kez vortekslenir ve 60°C'de 15 dk inkübe edilir.
15. Süre bitiminde tüpler oda sıcaklığına çıkarılır ve 300 µl Mycobacterium Selection Reagent eklenir. Üç kez vortekslenir ve 60°C'de 15 dk inkübe edilir. Süre 15 dk'yı geçmemelidir.
16. Tüpler 60°C'den çıkartılır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenir. (en az 5 dk)
17. Luminometrede uygun program seçilir. Cihazda yıkama için kullanılan

Detection Reagent I ve II seviyesi kontrol edilir . Cihaza birkaç kez yıkama yaptırılır.

Tüplerin dışı hafifçe silinerek önce kontroller sonra hastalar okutulur. Sonuçlar değerlendirilir.

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ:

Çalışma sonuçlarının kabul edilebilmesi için kontrol sonuçlarının beklenen değerlerde olması gereklidir.

Kontrol Sonucu (Birim olarak)

Negatif Kontrol < 20,000 RLU

Pozitif Kontrol $\geq$ 500,000 RLU

Hasta sonuçlarının değerlendirilmesi:

Test sonucu (Birim olarak)

YORUM

1) $\geq$ 30,000 RLU

⇒ M. tuberculosis complex rRNA'sı
saptandı.

2) < 30,000 RLU

⇒ M. tuberculosis complex rRNA'sı
saptanmadı.