

Mikrobiyolojide Moleküler Tanı Yöntemleri

Dr.Tuncer ÖZEKİNCİ
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D

Enfeksiyonun Özgül Laboratuvar Tanısı

- ✓ Mikroorganizmanın üretilmesi
- ✓ Mikroorganizmaya ait antijenik yapıların gösterilmesi
- ✓ Mikroorganizmaya özgü genetik materyalin gösterilmesi
- ✓ Mikroorganizmaya karşı konağın oluşturduğu özgül immun yanıtın gösterilmesi

- ✓ Mikroorganizmanın üretilmesi
- ✓ Mikroorganizmaya ait antijenik yapıların gösterilmesi
- ✓ **Mikroorganizmaya özgü genetik materyalin gösterilmesi**
- ✓ Mikroorganizmaya karşı konağın oluşturduğu özgül immun yanıtın gösterilmesi

Nükleik asit tanı testlerinin kullanımı

- ✓ Güç ve yavaş üreyen bakteriler
 - ✓ *Mycobacterium tuberculosis*
 - ✓ *Legionella pneumophilia*
- ✓ Kültürü yapılması riskli bazı bakteriler
 - ✓ *Francisella tularensis*
 - ✓ *Brucella*
- ✓ Canlı olmayan mikroorganizmalar
- ✓ Kültürün doğrulanması

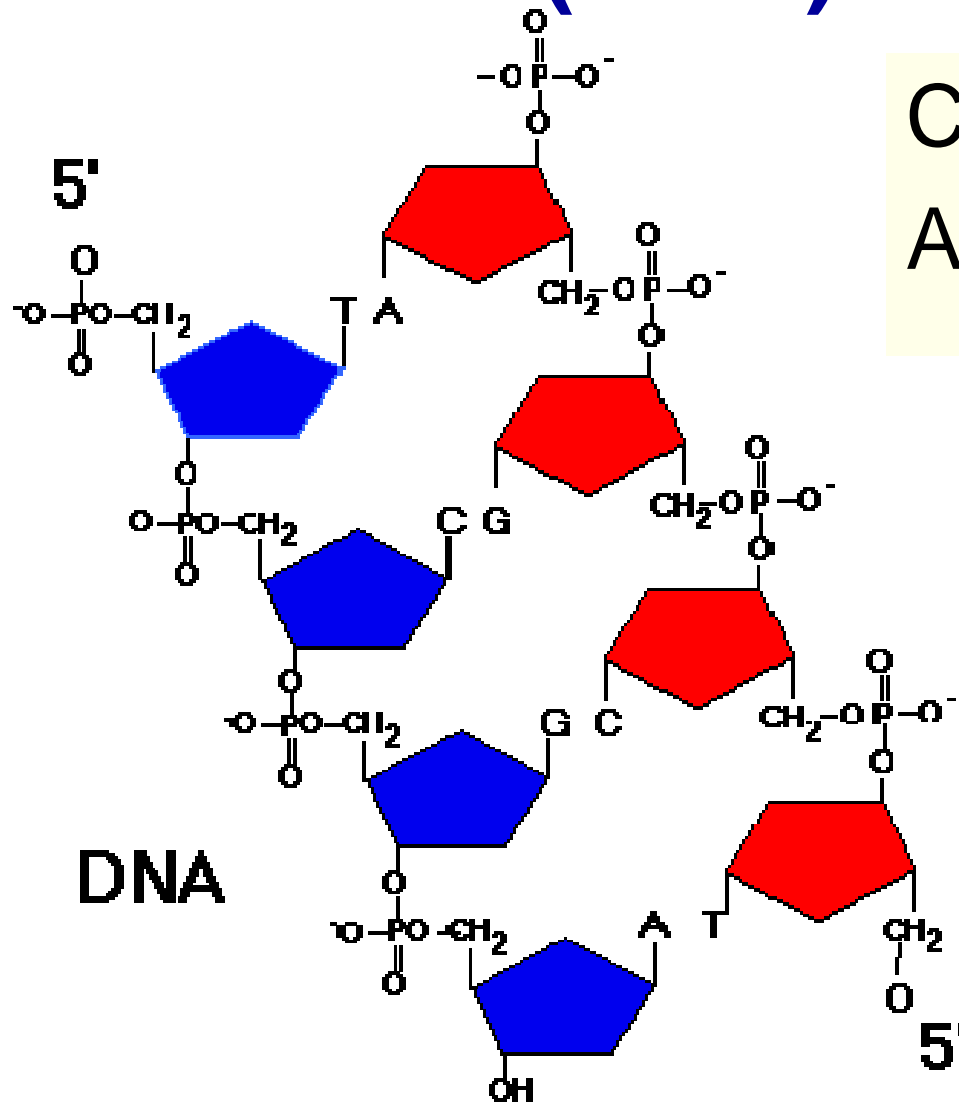
Nükleik asit tanı testlerinin kullanımı

- ✓ Kültürü yapılamayan viruslar
 - ✓ Human papilloma virus
 - ✓ Hepatitis B virus
- ✓ Örneklerde düşük düzeyde bulunan viruslar
 - ✓ Antikor negatif hastalarda HIV
 - ✓ Transplant yapılan hastalarda CMV
- ✓ Viral yük tayini :
 - ✓ Prognozun değerlendirilmesi
 - ✓ Antiviral tedavinin izlenmesi
 - ✓ Viral bulaşma riski

Nükleik asit tanı testlerinin kullanımı

- ✓ Genotip tayini
 - ✓ İnsan kanserleri ile ilişkili spesifik virus genotiplerini tespiti (HPV16)
- ✓ Antiviral ilaç ve antibiyotiklere dirençli suşların tanısı
 - ✓ HIV infeksiyonlarında terapiye karar verme
- ✓ Moleküler epidemiyoloji
 - ✓ Hastane ve toplumda çıkan salgınların ana kaynaklarının tespiti

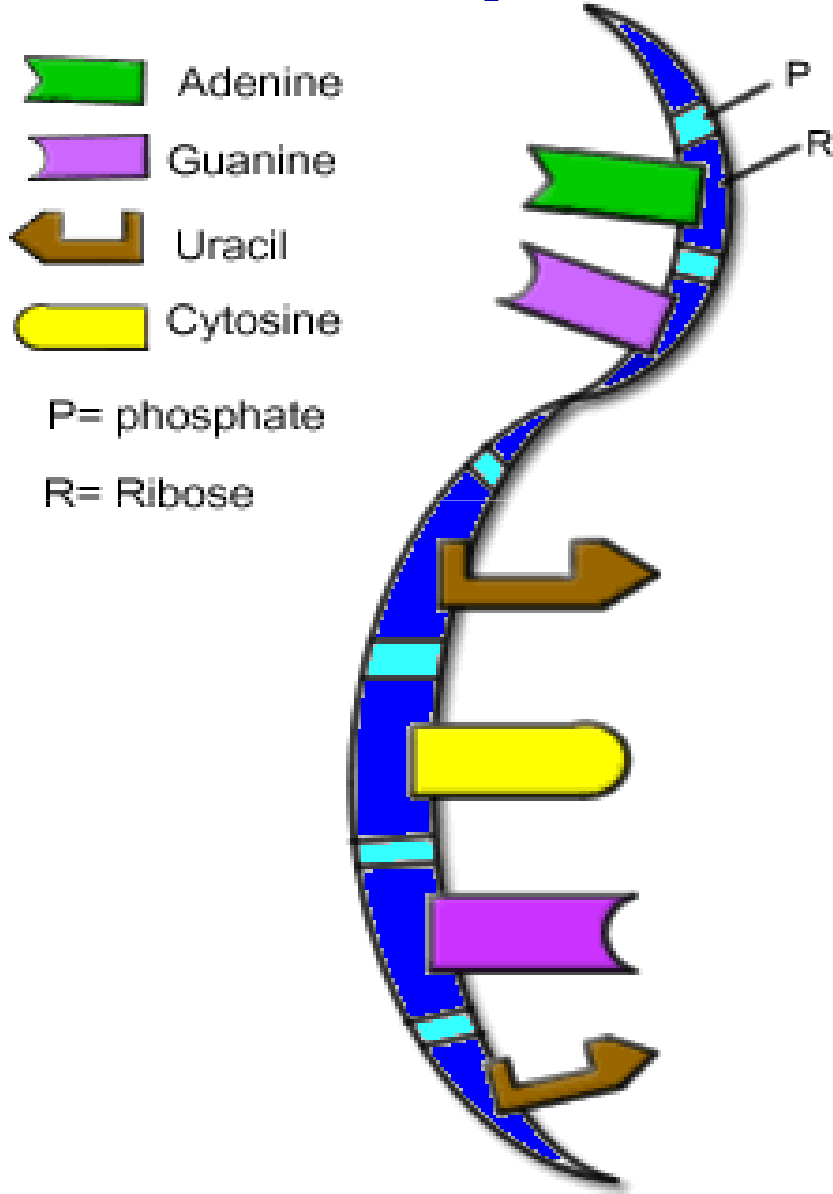
Deoksi-ribo-nükleik asit (DNA)



C /// G (üç H bağı)
A // T (iki H bağı)

DNA

RNA (Ribonükleik Asit)



- Şeker: Riboz
- Timidin yerine
→ Urasil

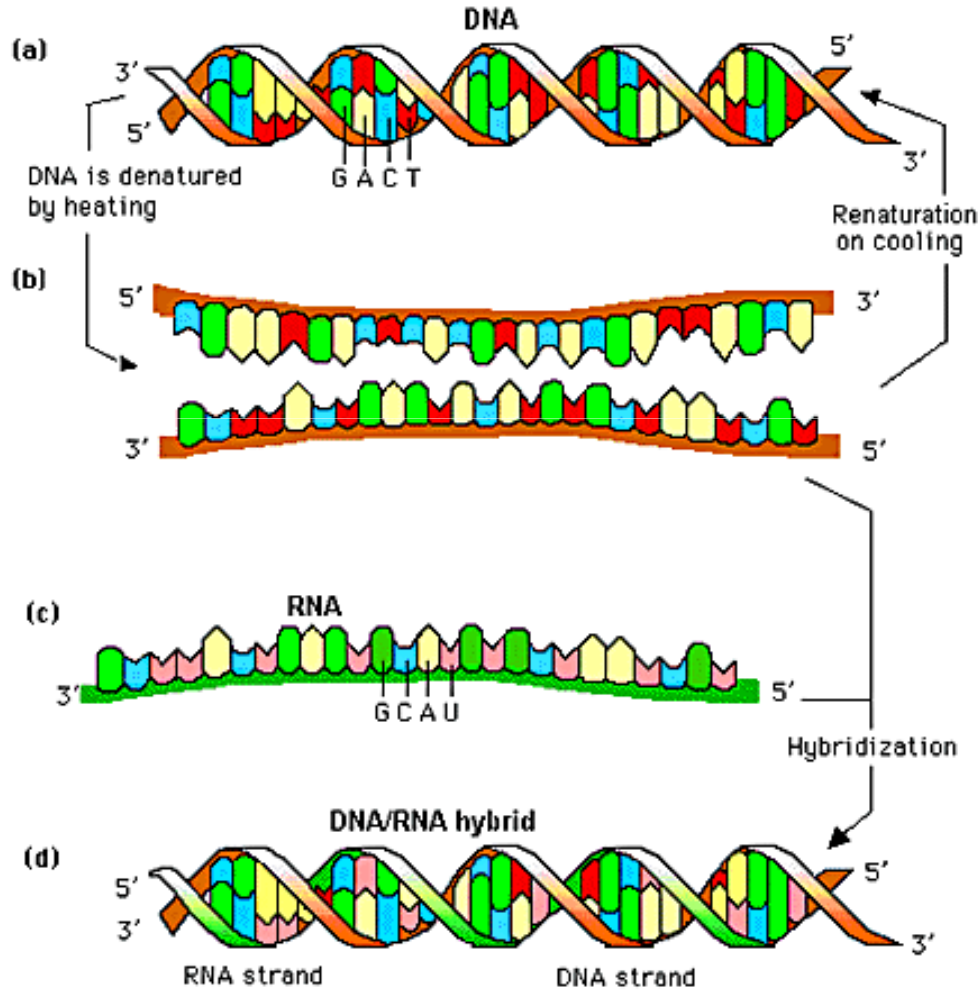
Nükleik asit tanı teknikleri

- ✓ Hibridizasyon teknikleri – Amplifikasyon metodları kadar sensitif değildir.
- ✓ Amplifikasyon teknikleri – Sensitivite artırmıştır.
 - Hedef amplifikasyon – Polimeraz zincir reaksiyonu; Polymerase chain reaction(PCR)
 - Prob amplifikasyon
 - Sinyal amplifikasyon
 - Bu tekniklerin kombinasyonları

Nükleik asit tanı teknikleri

- Hedef amplifikasyon
 - PCR - çeşitli mikroorganizmalar
 - NASBA - CMV, HIV-RNA
 - TMA - *M.tuberculosis*, HCV
 - SDA - *C. Trachomatis*
- Prob amplifikasyon
 - LCR – *Chlamydia*
- Sinyal amplifikasyon
 - bDNA - HBV, HCV, HIV

HİBRİDİZASYON



Hibrit = Melez

Hibridizasyon: Biribirine karşılık gelen (komplementer)

iki n.a. sarmalının (ipçiğinin) birleşmesi

İki sarmal yüksek ısıda ve alkali ortamda ayrılır (denatürasyon)

Nucleic Acid Hybridization

Nükleik asit Hibridizasyon Testleri

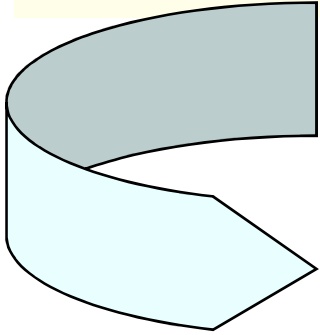
- Birbirinin karşılığı olan iki nükleik asit dizisinin özgül olarak birleşme özelliğinden yararlanılarak belirli n.a. dizilerinin araştırılması.
- Klinik örnekte araştırılan mikro-organizmaya ait DNA/RNA = **Hedef**
- Araştırılan DNA/RNA'ya karşılık gelen (komplementer) DNA / RNA = **Prob** (işaretli)

Klinik örnekten nükleik asit izolasyonu (ekstraksiyon)

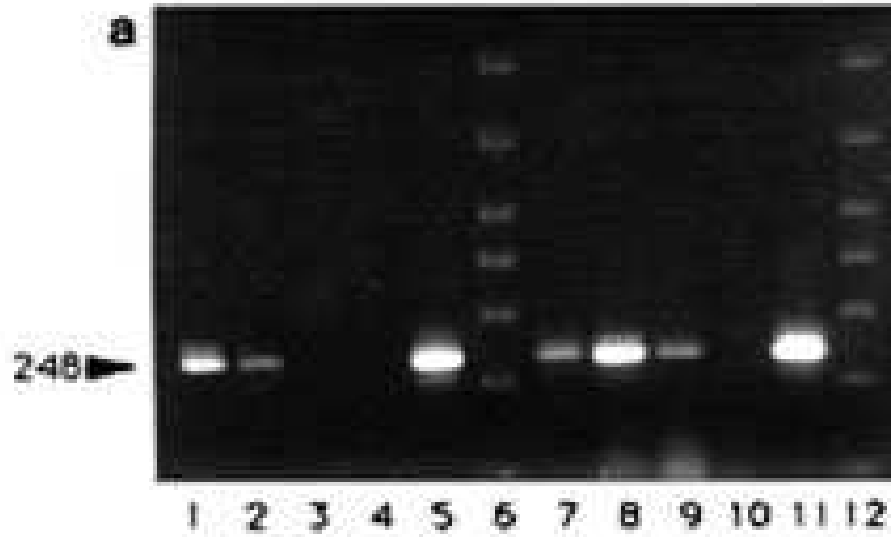
- ✓ Serum / plazma
- ✓ Doku örneđi (biyopsi)
- ✓ Vücut sıvıları (BOS)
- ✓ Hücreler (lökosit / lenfosit)
- ✓ Sürüntü örnekleri
- ✓ İdrar, dışkı vb.
- ✓ Kültür materyalleri

Klinik örnekten nükleik asit izolasyonu (ekstraksiyon)

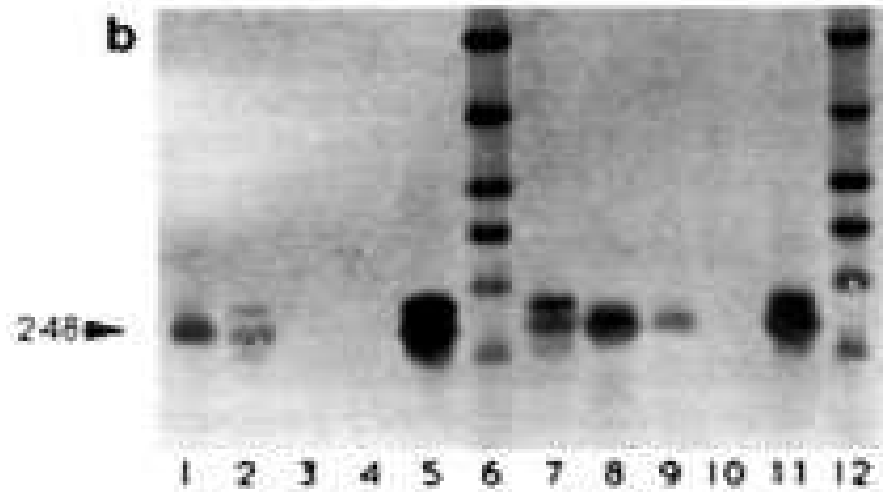
- Hücre duvarının parçalanması
- Proteinlerin parçalanması
- Sıvıda serbest hale geçen nükleik asitlerin saf olarak eldesi



Aranan mikroorganizmaya ait nükleik asitlerin araştırılması



İzole edilen n.a.lerin
elektroforezi
→Özgül prob ile
hibridizasyon



Nükleik asit çoğaltma (Amplifikasyon) Yöntemleri

Testin duyarlılığını arttırmak amacıyla:

➤ Hedef nükleik asitlerin çoğaltılması

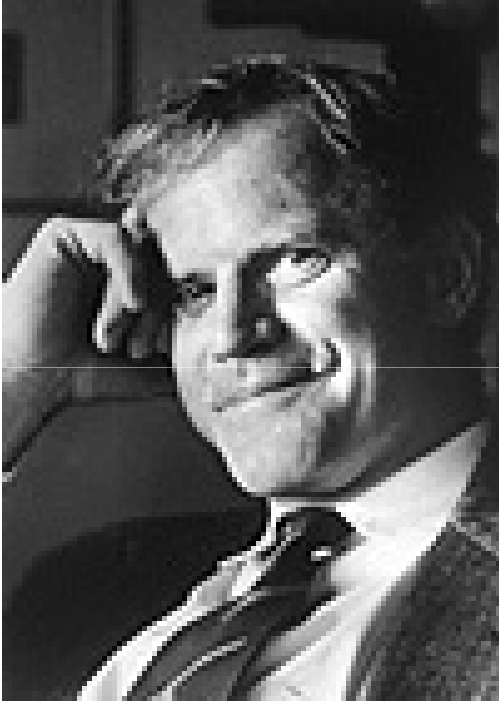
(polimeraz zincir reaksiyonu: PCR)

➤ Sinyal çoğaltma

bDNA

(dallı DNA; “branched DNA)

Polymerase Chain Reaction (PCR)



PCR tekniđi ilk kez
Dr.Kary B.Mullis,
tarafından 1983 yılında
bulundu.

Kimya Dalında
Nobel ödülü, 1993



Bilim adamı, yazar, sörfçü

**DNA Polimeraz enzimi ile
DNA parçalarının
çoğaltılması
→ Amplifikasyon**

Klinik örneklerde PCR

- Önce nükleik asit çoğaltılması
- Sonra saptanması
- Duyarlılık yüksek

➤ Klinik örneklerden – örn. serumdan
→ nükleik asit izolasyonu

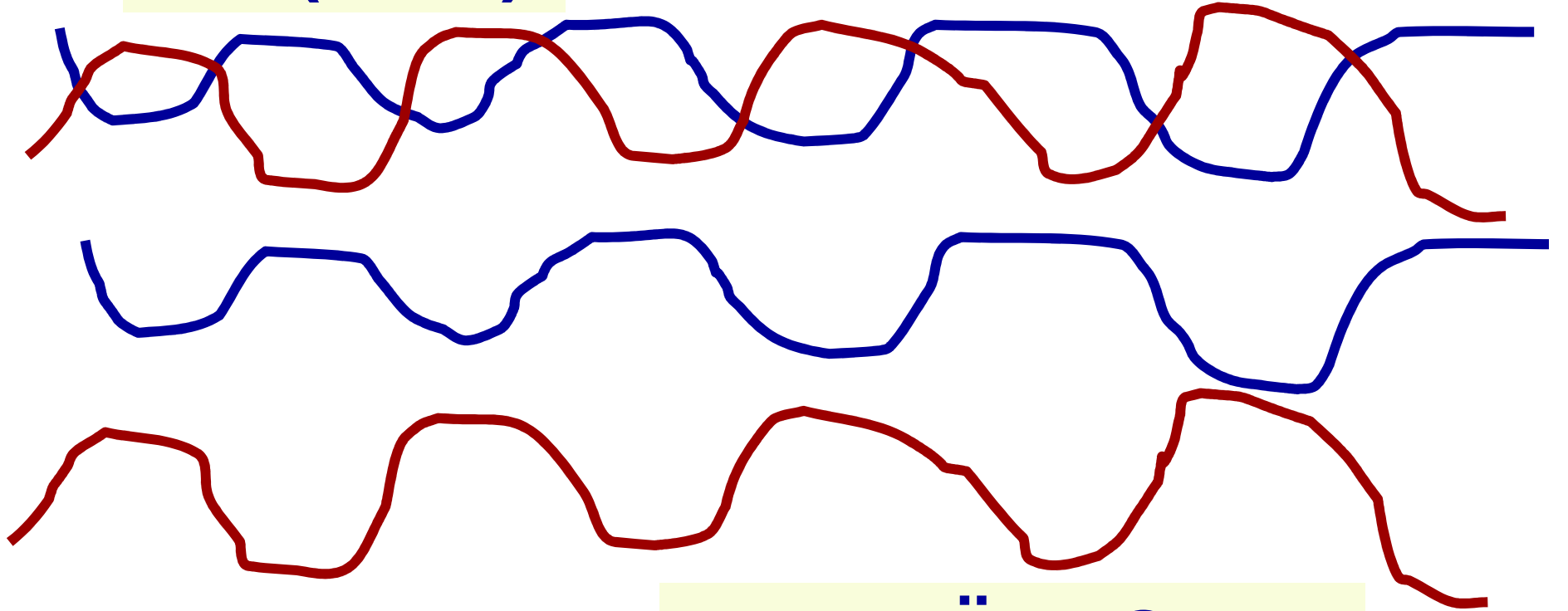
➤ PCR (DNA çoğaltılması)

➤ Özgül problarla saptama = hibridizasyon

DNA ipliklerini (sarmallarını)
Nasıl birbirinden ayırıp,
düzleştireceğiz?

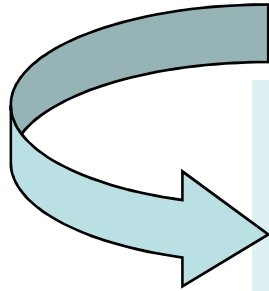
- **DENATÜRASYON**
- **YÜKSEK ISI (> 90-95°C)**

Isıt (95°C)



DENATÜRASYON

Primerleri Nasıl Bağlayacağız? = “ANEAL”



- **Isıyı Düşür**
- **55°C – 65 °C**

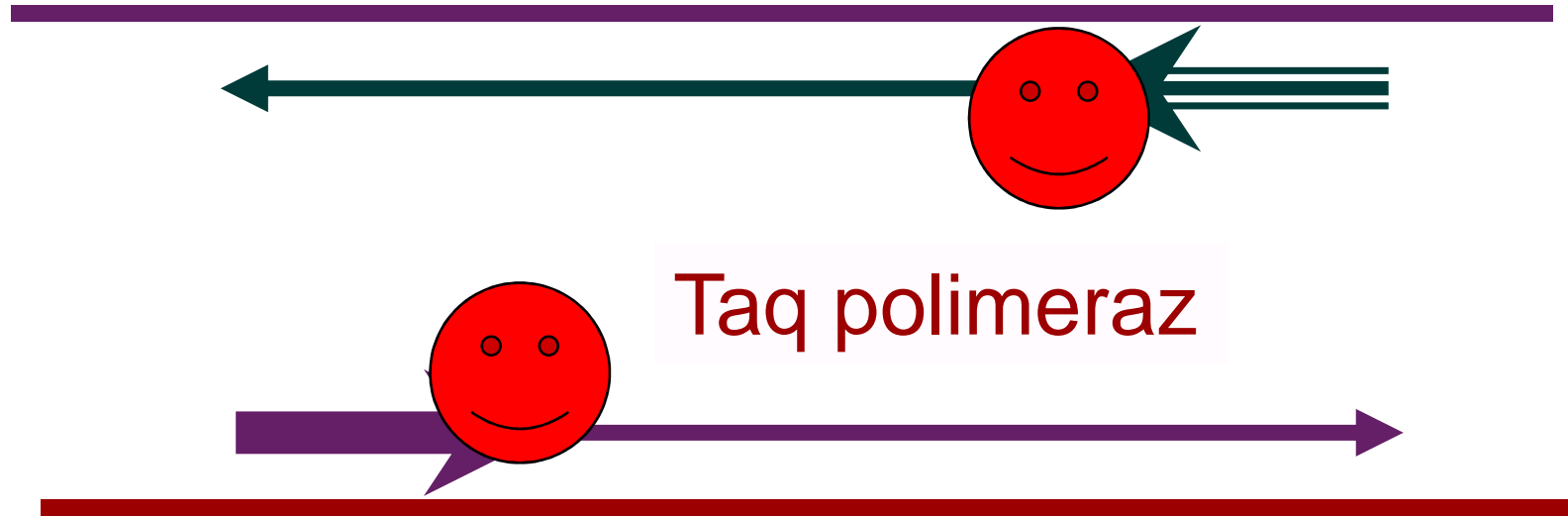
Oligonükleotidler
= Primerler
= Öncüller

55°C – 65°C → primerlerin bağlanması

DNA ipliklerini Nasıl Uzatacağız?



- **DNA polimeraz enzimi ile**
(Taq polimeraz; ısıya dayanıklı)
- **Enzim hangi ısıda çalışır?**
- **70-72°C'de**

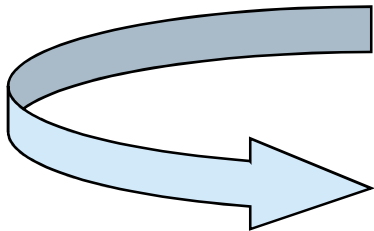


72°C

DNA ipliklerinin uzaması

PCR Basamakları: Segmentler

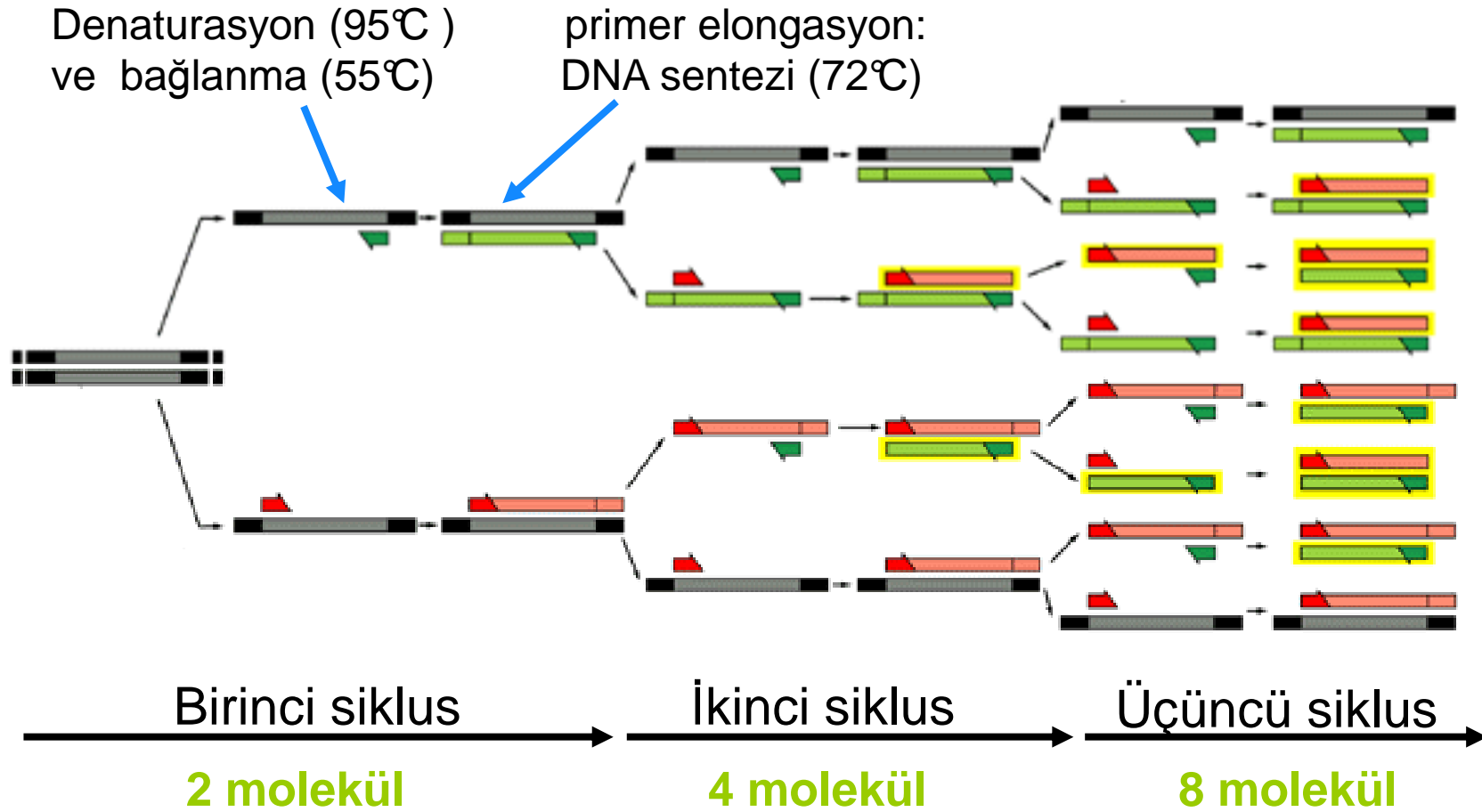
1. DNA ipliklerinin ayrılması (95°C)
2. Primerlerin bağlanması (55 – 65°C)
3. DNA ipliklerinin uzaması (72°C)



DÖNGÜ

DNA KOPYA SAYISI → x 2

Polymerase chain reaction (PCR)



EKSPONANSİYEL AMPLİFİKASYON ■■■■▶

Eksponansiyel çoğalma: 2^n

n = siklus sayısı

10 siklus = 1.024

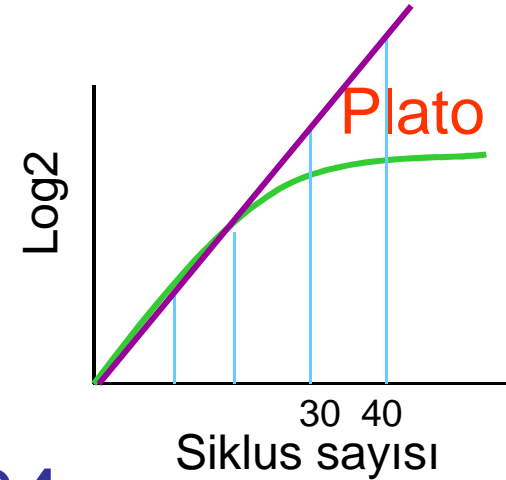
20 siklus = 1.048.576

30 siklus = 1.073.741.824

36. döngüde **68 milyar DNA kopyası**

Teorik olarak ; ideal koşullarda

Hayatta hiçbir şey mükemmel değildir !!



PCR aleti: Thermal cycller



RNA ile PCR yapabilir miyiz?

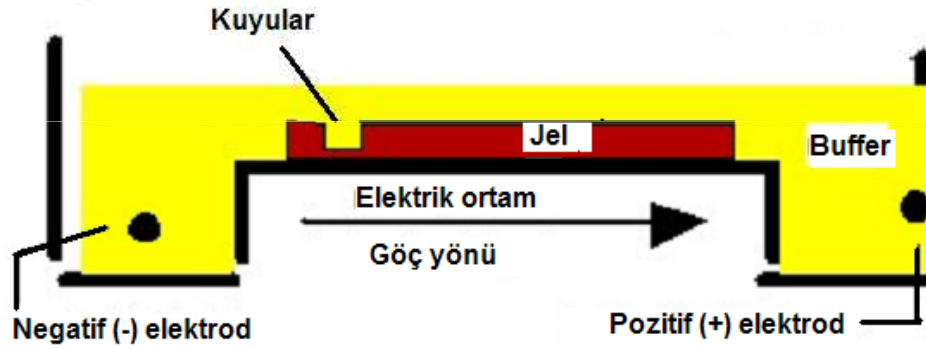
- RNA → revers transkriptaz enzimi
→ komplementer DNA (cDNA)
→ PCR → amplifikasyon

Ürünleri nasıl saptarız?

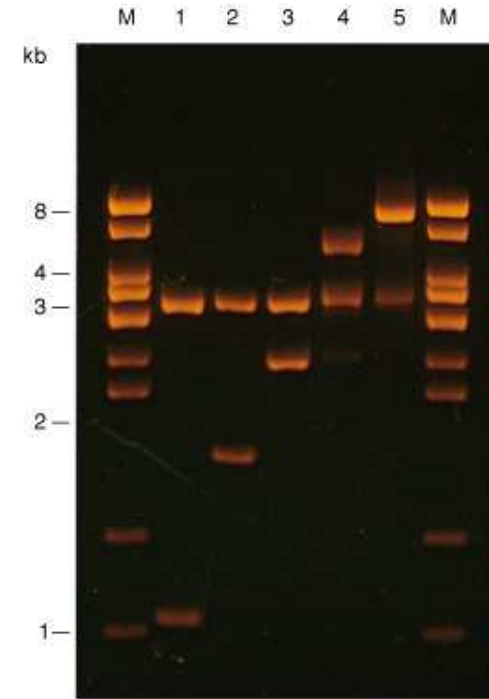
- Jel elektroforezi
- PCR ürünlerinin (cDNA) büyüklüğünü biliyoruz.
- Spesifik problarla (işaretli) hibridizasyon
- SAPTAMA (“DETECTION”)

PCR ürünlerinin tespiti

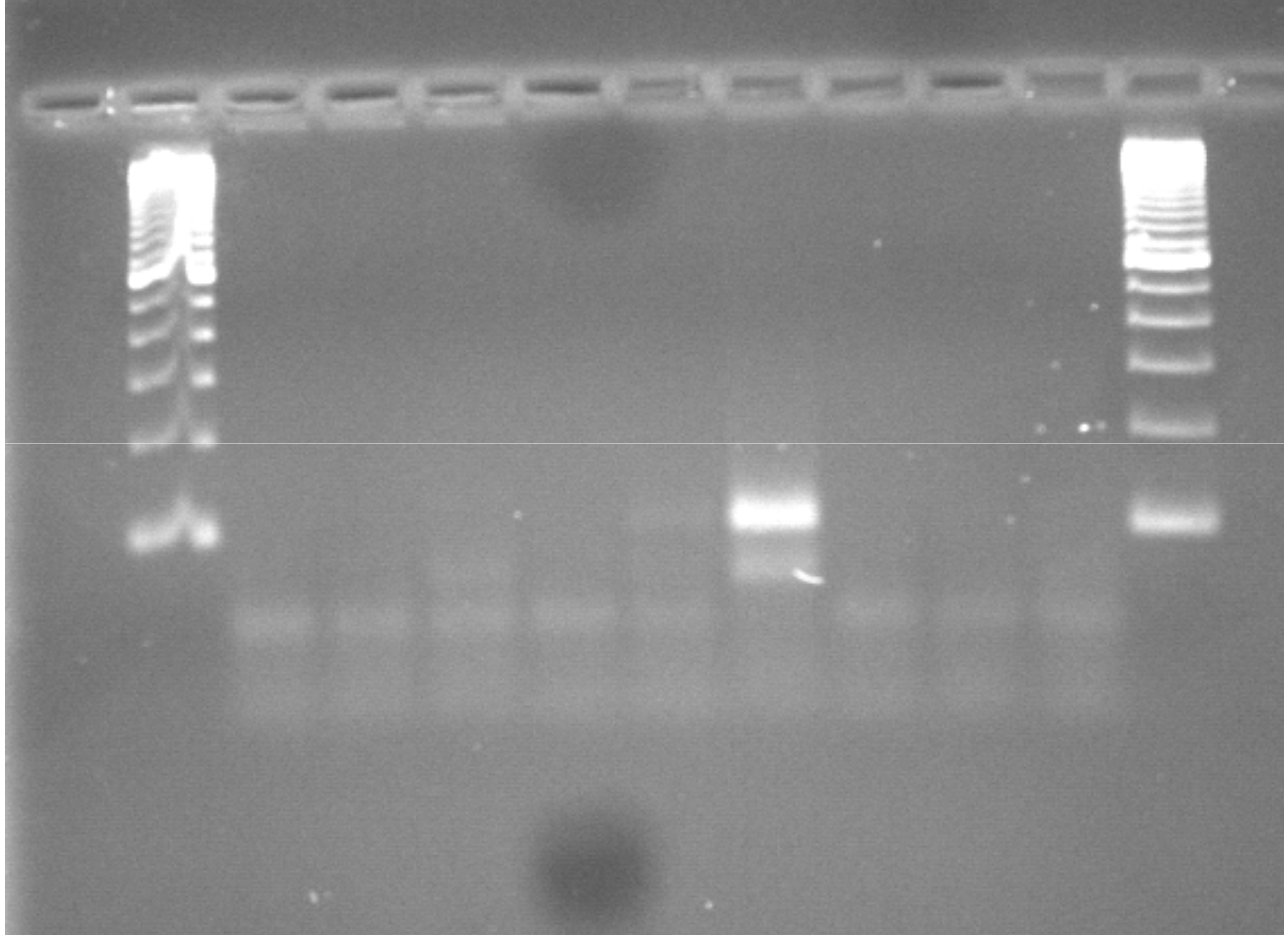
Jel elektroforezis



Jele konan Ethidium Bromide ($5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) DNA'ya bağlanarak DNA bandlarını UV ışığı altında görünür hale getirir.



PCR ürünlerinin jel elektroforezde tespiti



← DNA'nın
yüklediği kuyular

1000 bp

700 bp

600 bp

500 bp

**Spesifik DNA
sıralarının varlığı
için PCR
ürünlerinin
analizi**



DNA molekül
ağırlık markırları



PCR
ürünü



DNA molekül
ağırlık markırları

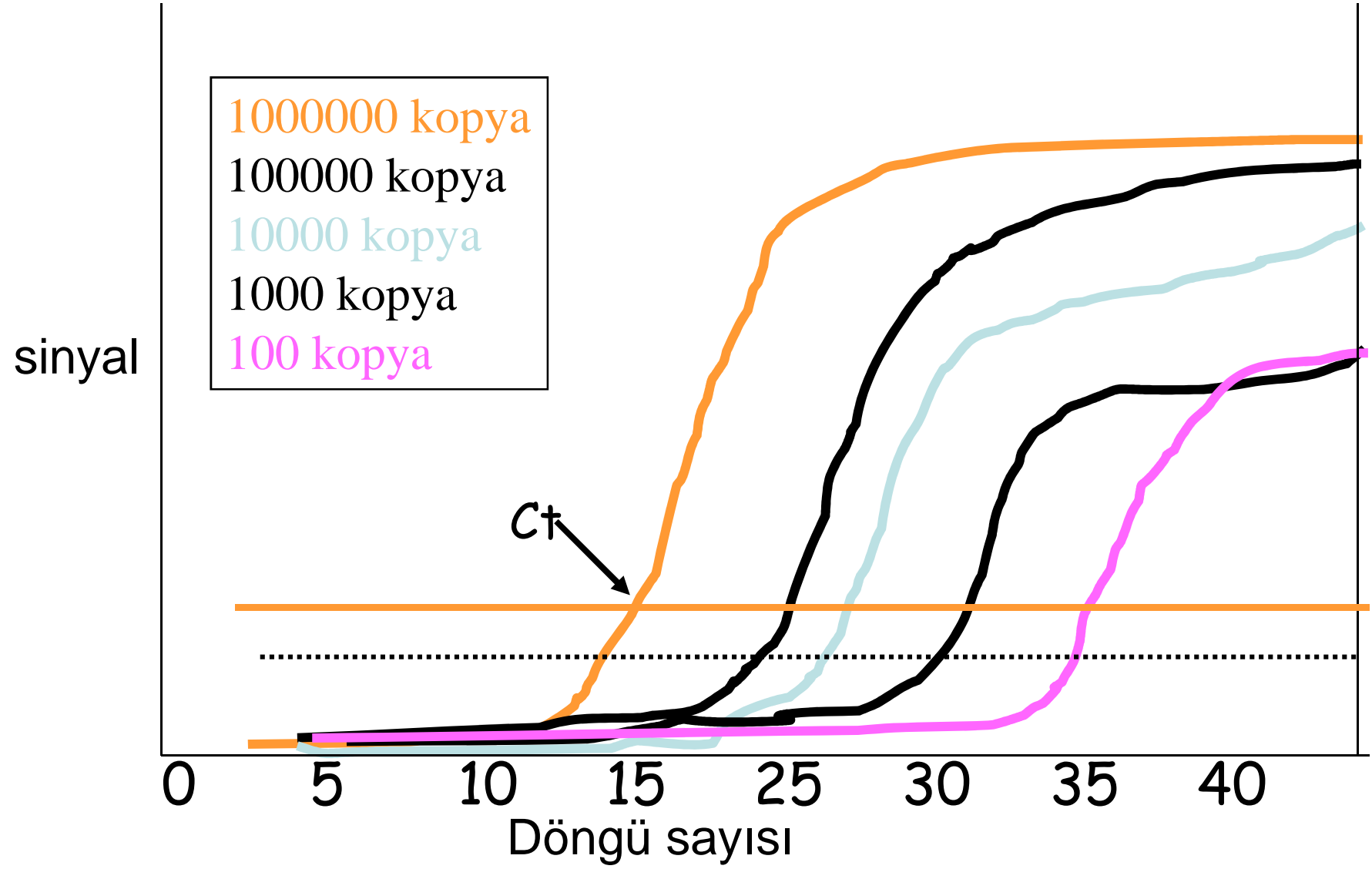
KLASİK PCR

→ PCR sonundaki ürünler (amplikonlar) saptanır; analiz edilir.

“REAL TIME PCR”

(GERÇEK ZAMANLI PCR)

→ PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeğe alınır.



- Nükleik asit testleri için örneklerin özel koşullarda alınması ve laboratuvara gönderilmesi gerekir.
- Nükleik asit testlerini uygulayan laboratuvarların özelleşmiş olması gerekir.