



33. TÜD GÖZ Oftalmoloji Kursu

29 - 31 Mart 2013

Congresium - Ankara

ATO Uluslararası Kongre ve Sergi Sarayı

ENFEKSİYONLARI

Prof. Dr. Fikret Mutlu anısına

KURS KİTABI

TÜRK OFTALMOLOJİ DERNEĞİ - ANKARA ŞUBESİ

Dr. Erdal YÜZBAŞIOĞLU

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İSTANBUL

Oküler enfeksiyonlarda tanı, oküler örneklerin mikrobiyolojik analizi ile gerçekleştirilir. Kültür ve boyama gibi konvansiyonel tanı testleri ile tanınması ve bulunması imkansız olan organizmaların tanınması günümüzde moleküler tanı yöntemleri ile mümkün olmaktadır. Oküler enfeksiyonların tanısındaki en önemli zorluklardan birisi de alınan örneklerin miktarının son derece az olmasıdır. Oysa moleküler yöntemleri uygulanabilmesi için yok denecek kadar az DNA bile yeterlidir. Endoftalmi gibi oküler enfeksiyonlarda mikroorganizmanın hızlı bir şekilde tanınarak spesifik tedavinin yapılması görmenin sağlanması bakımından son derece önemlidir. Moleküler yöntemlerle enfeksiyona neden olan türün tespiti saatler içinde yapılabilmekte ve tedavide konvansiyonel tanı yöntemlerine göre tartışmasız bir üstünlük sağlamaktadır. Moleküler tanının en büyük dezavantajı yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçla pahalı olması ve tekniğin standardizasyonunun olmamasıdır.

Başlıca moleküler mikrobiyolojik tanı yöntemleri;

- Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri
- Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (NAA)
- DNA dizi analizi dir.

DNA'nın çoğaltılabileceği bu teknik ilk kez 1983 de Kary Mullis adlı bir biyokimya tarafından geliştirilmiştir. Bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu(PZR); hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığ açmıştır. Metot basitçe tüpteki nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasır dayanır. Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır. Enfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı genellikle nükleik asit odaklıdır ve mikroorganizma ve klinik materyalden nükleik asidin izole edilmesi gereklidir. PZR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayar ve bu yöntemin uygulanabilmesi için tek bir DNA bile yeterlidir. PZR reaksiyonunda temel basamak vardır. Bunlar;

1- İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA temiz olmak zorunda değildir ve genomik DNA kurumuş kan ya da semen gibi adli tıbbi örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, tek bir saç teli, mumya kalıntıları ve foetal dokular gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95°C de yaklaşık 5 dk).

2- Sıcaklık 50 ile 70 °C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-20 nükleotitlik). Bunlar çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgü olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3- DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteride elde edilen enzim, Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70-

°C deki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi nükleotitleri 5'den 3' yönüne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Bu üç basamaktan oluşan reaksiyon seti çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon), primerlerin bağlanması (annealing), polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension) bir döngü olarak ifade edilir. DNA zincirlerinin sayısı her döngüde 2 katına çıkar ve bir döngü yaklaşık 4-5 dakika sürer.

Hücrelerde DNA doğal olarak, replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Buna göre hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçer. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıça göre üssel olarak artar.

PZR'nun teorik verimliliği;

$$\text{Teorik verim} = 2^n \times y$$

$$y = \text{başlangıçtaki kopya sayısı}$$

PZR'ın Kullanım Alanları

- Moleküler biyoloji ve biomedikal araştırmalar
- Patojenin tanınması (Bakteriyel, viral, fungal ve protozoal hastalık etkenlerinin teşhisi)
- Gıda, su ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısı
- Genetik bozukluklar ve kanser taramaları
- Prenatal tanı ve cinsiyet belirlenmesi
- Gen tedavisi ve DNA aşılı
- Adli tıpta suçlu teşhisi
- Antropoloji

Patojenin Tanınmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Nükleik Asit Prob Hibridizasyon Yöntemleri

Moleküler yöntemlerin en eski ve en basit şeklidir. PZR ürünlerinin cinse veya türe özgün oligonükleotid problemleriyle hibridizasyonu ile patojenin cins veya tür seviyesinde tanınmasını sağlar. Prob tek zincirli DNA veya RNA dizisi olup, ilgi duyulan genin zincirinin komplementeridir. Kültürü veya identifikasyonu zor olan mikroorganizmaların genomlarının tesbit edilerek, identifikasyonunun kolayca yapılabilmesi en önemli avantajıdır. Bir defada sınırlı sayıda patojenin işleme alınması, yaygın olmayan patojenlerin ön kültürlerinin ve duyarlılık testlerinin yapılmasının gerekli olması, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların fazla olması ise en önemli dezavantajlarını oluşturur.

Cins veya Türe Özgün PZR

Önce evrensel veya geniş aralıklı (Board-Range) primerlerle bakteri yada mantar DNA'sı saptanır. Geniş aralıklı PZR endoftalmi ve keratit tanısında en sık kullanılan yöntemdir. Burada temel amaç enfeksiyonun bakteriel yada mantar kökenli olduğunun tespit edilmesidir. Cinsine özgün DNA saptandığında (mantar veya bakteri) özgün primerlerle ikinci bir PZR'na (ardışık PZR) tabi tutulur. Böylece bakteri yada mantarın türünün tespiti amaçlanır.

GÖZ ENFEKSİYONLARI

Çoklu PZR

Farklı hedeflere özgün birden fazla sayıda primerin aynı tüpe konulmasıyla çok sayıda hedef sıralarının eş zamanlı amplifikasyonunu sağlayan bir yöntemdir. Tek bir örnekte birden fazla patojenin tanınmasına olanak sağlar. PZR sonrası amplifiye olan DNA kopyasının her üç yöntemde de (geniş aralıklı, ardışık ve çoklu PZR) ethidium bromid ile boyanıp elektroforez yapılarak görüntülenmesi sağlanır.

Gerçek Zamanlı PZR

Aynı reaksiyon tüpünde ve aynı anda amplifikasyon ve saptamanın gerçekleştirilmesidir. Gerçek zamanlı PZR'da indikatör olarak floresans en iyi tercihtir. Bu yöntemde amplifikasyon sonrasında tanıma için taşıma gereksinimini ortadan kaldırdığından kontaminasyon riskinin azaltılması en önemli avantaj olarak değerlendirilir. Viral ajanların çalışılmasında oldukça değerli bir yöntemdir.

Polimorfizm Analizi

PZR ürünü amplifikasyondan sonra endonüklezlarla karşılaştırıldığında sınırlayıcı parça uzunluk polimorfizmi profilinde değişikliğe neden olurlar. Bu polimorfizm analizi endoftalmi nedeni olan bakteri ve mantarların tür seviyesine tespitinde kullanılmışlardır. PZR ürünü spesifik genetik lokuslardaki sıra değişkenliği saptanabilir. Bu yöntem keratite nedeni olan mantarların tanınmasında kullanılmıştır. Polimorfizm analizinin en önemli dezavantajı tanının gerçekleşmesi için spesifik primer veya problemlerin seçilmesi zorunlu olduğundan etken ajandan şüphelenilmesi gereklidir.

Nükleik Asid Sıra Analizi

Nükleotidin boyut, kompozisyon ve sırasını dikkate alarak en fazla bilgiyi sağlar. Etken ajan şüphesi gereksinimi yoktur. Hem bakteri, hem de mantar endoftalmilerinin tespitinde kullanılır. Kültüre edilemeyen veya yeni patojenlerin neden olduğu enfekte insan dokusu veya kanından bu yöntemle direk olarak etken ajan tanınabilmektedir.

Endoftalmi'de PZR

Birçok kronik endoftalmi olgusunda kültürde üreme olmamasına rağmen antibiyotik tedavisine cevap verdiğini görmekteyiz. Steril endoftalmi olarak kabul edilen bu durumda aslında mikroorganizmaların sebep olduğu kuvvetle muhtemeldir. Kültür negatif olan bu endoftalmilerde PZR tekniği ile bazı bakteri türlerinin enfeksiyona neden olduğu gösterilmiştir.

PZR tekniklerinin gelişmesi ile ribozomal genler hedef olarak kullanılmaya başlanmış olup böylece yöntemin sensitivitesi artmış, spektrumu genişlemiştir. Geç başlangıçlı gecikmiş tip bakteriel endoftalmiye neden olan P.acnes enfeksiyonunda spesifik primerlerle P.acnes DNA'sını saptamak ve amplifiye etmek mümkündür. Direk olarak tür tespitine olanak sağlayan ardışık PZR tekniği ile en sık endojen endoftalmi nedenlerinden olan Candida ve Aspergillus tanınabilmektedir. Öte yandan özellikle travmatik endoftalmilerde, hatta bazen cerrahi sonrası endoftalmilerde spektrum çok geniş olacağından bu olgularda geniş aralıklı primerler kullanılsa bile etken ajanın saptanamadığı olmaktadır.

Keratitlerde PZR

Fungal keratitlerin %20 si gerek mikroskopi, gerekse kültürde tanınmamaktadır. Bakteriel keratitlerde en iyi tanı yöntemi kültür olmasına karşın, kültürde üremenin saptanamadığı durumlarda ve alınan örneğe bulaşın en az seviyede tutulabildiği kornea biyopsisinden alınan örneklerde PZR uygulaması doğru bir yaklaşım olacaktır.

Kültür negatif olan derin stromal enfeksiyonlarda ve enkapsüle bakterilerde de PZR uygulanması önerilmektedir.

Türe spesifik tedavi uygulamak ve böylece ilaç direncini kırarak etkin bir tedavi yapmak enfeksiyon hastalıklarında oldukça önem taşımaktadır. Bunun için patojen türü saptamak gereklidir. Bu amaçla PZR yönteminin kullanılması sırasında evrensel ya da geniş aralıklı primerlerin kullanılması ve sıralamayla tanınması (PZR'in otomatik DNA sıralamasıyla kombine edilerek kullanılması) önerilmektedir.

Viral keratitlerde genellikle adenovirus, chlamidya, HSV, cytomegalovirus, varisella zoster, Epstein-Barr virusu gibi birden fazla enfeksiyöz ajanın belirlenmesi istenmektedir. Böyle durumlarda da farklı patojenlere spesifik primerlerin katkısıyla yapılan PZR (çoklu ya da ardışık PZR) tekniklerinin kullanılması önerilmektedir.

PZR Testi İçin Hastadan Örnek Alınması

Konjoktiva ve korneadan yumuşak uçlu aplikatör veya kimura spatülü yardımı ile alınabilir. Aköz ve vitreus örnekleri ise enjektörle alınabilirler. Alınan örnekler işlemin yapılacağı yere mümkün olan en kısa zamanda iletilmelidirler. Eğer bir gecikme olacaksa bekleme süresi buzdolabı koşullarında olmalıdır. Değişken sıcaklıktaki bekleme test sonucunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Tanı amaçlı Florescin ve Bengal boyalarının kullanılması PZR da kullanılan problemlerle karışabilmektedirler. Bu boyaların kullanılması halinde bu bilginin mutlaka moleküler tanı merkezi ile paylaşılması gerekmektedir. Moleküler tanı merkezlerinde bazen örneğin transportu için özel ortamlar kullanılabılır. Bunun için örneği alan oftalmoloğun laboratuvarla ilişki içinde olması özellikle önerilmektedir.

Gelecek

Moleküler tanı yöntemleri hızla gelişmekte ve mikroorganizmaların yalnızca türlerinin değil, farklı genotiplerinin farklı derecede patojen olabilecekleri yönünde ciddi çalışmalar vardır. Mikroorganizmaların genetik varyasyonlarının değerlendirilerek daha patojen olan varyasyonların tanınmasıyla birlikte enfeksiyonların daha hızlı ve etkili bir şekilde tedavi edilmelerinin sağlanacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- 1- Seal D, Player U, Booton G, Ferrer C, Gardner S, Kowalski R, Thomas P Moleküler Biyoloji Kapran Z, Eser İ, Oküler Enfeksiyonlar, 2. Baskı, Newyork-London, Informa Healthcare, 2007;61-103.
- 2- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad JL, Alio LJ. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections *J Clin Microbiol* 2001;39:2873-2879.
- 3- Hykin PG, Tobal K, McIntyre G, Matheson MM, Towler HM, Lightman SL, The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples *J Med Microbiol* 1994;40:408-415.
- 4- Therese KL, Anand AR, Madhavan HN. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis *Br J Ophthalmol* 1998;82:1078-1082.
- 5- Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, Di Cerase JL, Haff L, Atlas RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indications in water *Mol Cell Probes* 1990;4:353-365.
- 6- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Pesing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin resistant staphylococci in the clinical laboratory *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1768-1772.
- 7- Hidalgo JA, Alangaden GJ, Elliott D, et al. Fungal endophthalmitis diagnosis by detection of *Candida albicans* DNA in intraocular fluid by use of a species-specific polymerase chain reaction assay *J Infect Dis* 2000; 181:1198-1201.
- 8- Whitcombe D, Newton CR, Little S. Advances in approaches to DNA-based diagnostics *Curr Opin Biotechnol* 1998;9:602-608.
- 9- Whitcombe D, Brownie J, Gillard HL, et al. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping *Clin Chem* 1998;44:918-923.
- 10- Okhravi N, Adamson P, Matheson MM, Towler HM, Lightman S. PCR-RFLP mediated detection and speciation of bacterial species causing endophthalmitis *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1438-1447.
- 11- Kumar M, Mishra NK, Shukla PK. Sensitive and rapid polymerase chain reaction based diagnosis of mycotic keratitis through single stranded conformation polymorphism *Am J Ophthalmol* 2005;140:8501-857.
- 12- Orkhavi N, Adamson P, Mant R, et al. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism mediated detection and speciation of *Candida* spp causing intraocular infection *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:859-866.
- 13- Jackson R, Morris DJ, Cooper JR, et al. Multiplex polymerase chain reaction for adenovirus and herpes simplex virus in eye swabs *J Virol Methods* 1996;56: 41-48.
- 14- Anand A, Madhavan H, Neelam V, Lily T. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of fungal endophthalmitis *Ophthalmology* 2001; 108: 81-85.
- 15- Orkhavi N, Adamson P, Carrol N, et al. PCR based evidence of bacterial involvement in eyes with suspected intraocular infection *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3474-3479.