

MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE ÇOKLU VE HIZLI SAPTAMA YÖNTEMLERİNDE GELİŞMELER*

Kenan MİDİLLİ, Salih TÜRKÖĞLU

* Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

** İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Tıpta tüm tanı laboratuvarı disiplinlerinde hedef ideal teste ulaşmaktır. Bunu hem hızlı, hem ekonomik, hem de doğru gerçekleştirmek için son yıllarda çok yol kat edilmiştir. Testler hız kazanmış ve özellikle infeksiyon hastalıklarının tanısında bir seferde çok sayıda mikroorganizmanın saptanması hedeflenmiştir. Bunun için yeni teknolojiler ve cihazlar laboratuvarlarımıza girmiş ve girmektedirler. Bu oturumda yeni teknolojiler çeşitli yönleri ile ortaya konmuş, katılımcıların deneyimleri ile beslenerek bir yön çizilmeye, bir yol haritası ortaya konmaya çalışılmıştır.

Anahtar sözcükler: çoklu tanı, hızlı tanı, moleküler mikrobiyoloji

SUMMARY

Advances in Multiplex and Rapid Detection Methods in Molecular Microbiology

An ideal diagnostic test is the ultimate goal of nearly all medical diagnostic laboratories. Significant progress has been made to realize it rapidly, economically and reliably. Tests, faster than today, particularly in the diagnosis of infectious diseases will render the diagnosis of a large number of microorganisms in a single session with new instruments which many are under development. In this meeting, these new technologies have been discussed with the contribution of the participants with significant know-how.

Keywords: multiplex tests, rapid tests, molecular microbiology

GİRİŞ

Çoklu ve hızlı testlerin infeksiyon hastalıklarında kullanımına geçmeden önce genel olarak moleküler tanı testlerinin ülkemizde ne durumda olduğu konusunda bir saptama yapmak yarar vardır. Çok genel birşeyler söylemek gerekirse ki, ayrıntılı bir dokümantasyon yapmak ve veri oluşturmak oldukça güçtür. Moleküler testlerin infeksiyon hastalıkları konusunda hemen her yerde, her düzeyde, bir şekilde kullanılmaya başlanmış olduğunu görüyoruz. En azından, son yıllarda, başta real-time

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'ı (ve yöntemlerini) gerçekleştirebilmek için birçok yerde yatırım yapılmış durumdadır. Bir yandan da mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle saptanmasının üzerine, bu saptananların ayrınılı araştırılması ve özellikle moleküler epidemiyolojileri için DNA dizi analizleri (dizileme) alt yapıları da birçok merkezde kurulmuş durumdadır. Bugün bu yöntemlerin nerelerde, ne yoğunlukta ve ne kadar doğru bir amaca hizmet ettikleri konusu büyük bir soru işareti olarak durmaktadır. Dünyada yeni uygulamaya giren (girmeye başlayan-girecek olan) yeni ve çoklu/

Yazışma adresi: Salih Türkoğlu. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel.: (0212) 414 20 00/32307

e-posta: salih.turkoglu@gmail.com

Alındığı tarih: 07.10.2008, revizyon kabulü: 09.10.2008

*23 ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi'nde Kahvaltılı İnteraktif Oturum-2 sunumu (28 Mayıs-01 Haziran 2008, Çeşme-İzmir)

hızlı yöntemlere geçmeden hemen önce yapacağımız çok güncel bazı vurgulamalar tartışmamıza da ışık tutacaktır.

Moleküler yöntemleri doğru ve optimal kullanan merkezlerin çalışmalarından bazı örnekler

Son yıllarda ülkemizde karşılaştığımız bazı virus infeksiyonlarının ortaya çıkarılması ve karakterize edilmesi hızla mümkün olmuştur. Buna "kuş gribi" salgınının, Kırım-Kongo kanamalı ateşinin ve "Norovirus" salgınının ortaya çıkarılması çok iyi örnekler olarak gösterilebilir. Çok daha güncel ve çok daha yakından şahit olduğumuz Aksaray ilimizde ortaya çıkan gastroenterit etkeninin hızla belirlenmesi ve adının "Norovirus" olarak konması, hatta hemen dizilenerek (henüz bu veriler çok taze olup üzerlerinde çalışılmaya devam edilse de) belli coğrafi ve filogenetik ilişkilendirmelere olanak sağlayan verilerin elimizde olması, moleküler yöntemlerin doğru ellerde ve doğru kullanıldıklarında son derece verimli sonuçlar sağladıklarını göstermektedir (Çok yakın tarihlerde gerçekleştiği için kısaca bunları saydık ancak, ülkemizde viral hepatitler başta olmak üzere, özellikle, örneğin herpesviruslar, HIV gibi bazı farklı virus gruplarında son derece önemli ve iftiharla anabileceğimiz ekiplerin çalışmaları da kayda ve anmaya değerdir).

Kategorize etmek

Bugün moleküler yöntemlerin, rutin tanıda kullanımı ile ilgili olarak, kullanıldıkları kurumları çok genel olarak kategorize edersek, tüm altyapı ve tam bir bilgi birikimi (ekip) ile donanmış olanlar (ideal) başta olmak üzere, belki iki grup daha tanımlamak olasıdır: moleküler yöntemlerin temel altyapısı olmadan tamamen üstyapısı bulunanlar ve bu üstyapıyı yeterli bilgi birikimi ve ekip olmadan bulunduranlar. Burada altyapıdan kasıt, DNA/RNA'yı "işlemek" ile ilgili tüm donanımın bulunması, üstyapıdan kast edilen ise, tek bir "real-time" altyapısı ve bununla ilgili cihazların bulunmasıdır.

"Moleküler eğitim"

Gelecekte, çok yakın gelecekte, moleküler yöntemlerin laboratuvarlarımıza çok daha fazla

gireceği aşıkardır. Bu durumda, bugün için yapabileceğimiz çok önemli bir şey eğitimidir. Doğru yerde, doğru yöntemler kullanmak gerekiyor; ülkenin ve kurumların maddi koşullarını gözeterik, sağlık sisteminin kaldırabileceği şekilde, onu destekleyen, çeşitli politikalar oluşturmada rol oynayabilecek, kaliteli işler çıkarmak için her yönden donanımlı olmak şarttır. Hiç olmazsa teorik olarak donanımlı olmak. Peki bu olası mı? Yalnızca "teorik" olarak bu yöntemlere hakim olmak mümkün mü? Çeşitli görüşler bulunmaktadır bu konuda. Görünen odur ki, DNA/RNA çalışmalarında belli bir yere gelmiş uzmanların (ve hocalarımızın) altyapılarında her zaman bu yöntemler ile ilgili tüm altyapı mevcuttur. Basit bir jel elektroforezinin, eğitimin en başında, gerek öğrencilerimize, gerekse çeşitli ilgili uzmanlık alanında eğitim alan asistanlarımıza öğretilmesi gerektiği ve artık birçok yerde bunun uygulanmaya başlandığı görünmektedir. "Moleküler eğitimin" artık standart ve düzenli bir şekilde verilmeye başlanması gerekliliği üzerine bugün hiç kuşku yoktur. Uygulamada, tıp fakültelerinde bu eğitimin zaten birçok dalda başlanmış olduğu göze çarpmaktadır. Biyofizik ve biyokimya dallarında, bu temel verilmektedir. Mikrobiyoloji ve genetik dalları da, kendi alanlarına yönelik bunu tamamlayıcı eğitim vermektedirler. Günümüzün artık popüler olmuş bir konusu olan genetik/gen mühendisliği bu sayede orta öğretimde bile yer bulabilmektedir. Yani, daha dün diyebileceğimiz bir yakın geçmişte, tıp fakültesi eğitimi sürecinde kuramsal ya da uygulamalı olarak hiç yer almayan, DNA ve RNA ile ilgili tüm bilgilerinin, örneğin bir mikrobiyoloji uzmanlığında "yeniden hatırlatıldığı" bir kuşak söz konusu iken, çok yakın bir gelecekte her kademedeki öğrencilerimizin çok daha donanımlı olacaklarını umut etmek için nedenlerimiz çoktur.

Ancak, moleküler yöntemler ile ilgili tam bugüne baktığımızda, yukarıda söylenenlere ek olarak şöyle bir saptama yapılması mümkündür: belli merkezlerde bu yöntemlerin belli düzeylere gelmiş olması, bu konuda duyulan "heyecanın" ürünü olup, bireysel başarıları da çoğu kez. Ülkemizde genel olarak yapılan şeyler pek "planlı-programlı" olamıyor. Molekü-

ler yöntemlerin hangi çerçevede kullanılacağını da iyi tartışmak gerekiyor. Örneğin salgınlarda nasıl kullanılacak ve yönlendirici kim olacaktır? Rutin kullanım nasıl olacaktır? Halk sağlığı ile ilgili konularda örneğin, sağlık otoritesinin laboratuvarları söz sahibi olmalıdır. Bugün bunun tam olarak sağlanıp sağlanmadığı önemli bir konudur.

İdeal bir laboratuvar test formatından beklenenler minimum örnek miktarında, mümkünse anında olası etkenlerin tümünü ve bu etkenlerin klinik (direnç gibi) ve epidemiyolojik açıdan kritik öneme sahip özelliklerinin saptanmasına olanak vermesidir. Doğal olarak tüm bunları olanaklı kılan bir test formatı henüz geliştirilmemiştir. Bununla birlikte, özellikle nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAT) ve bunların çeşitli saptama sistemleri ile kombinasyonları ve minyatürize edilmeleri ile geliştirilen test formatları yukarıdaki ideale giden yolda önemli mesafeler olup oldukça ümit vaat edicidir⁽¹²⁾. Ancak bütün bunlar sağlanırken, bu test formatları doğaları gereği bazı sakıncaları da beraberlerinde getirmektedir. Bunlardan en önemlilerinden biri özgüllük sorunu, diğeri ise inhibisyonudur. Öte yandan, bu test formatlarının büyük çoğunluğu henüz geliştirilme aşamasında olduklarından klinik kullanımda yer alabilmeleri için standardizasyon gereklidir ve "ince ayarlarının" yapılması için zamana gereksinim vardır. Bir diğer sorun da test maliyetleridir. NAT tabanlı testler genelde klinik kullanım açısından kabul edilebilir bir sonuç alma süresine sahip olsalar da, başta "biyoterörist" saldırılar ve gıda güvenliği olmak üzere, tedavi alanındaki gelişmelerle birlikte ortaya çıkan hızlı tanı ve tedavi kararı gerektiren klinik durumlarda bu süreler yetersiz kalabilmekte ve sahada ya da hasta başında anında sonuç alınması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Günümüzde moleküler testler, genelde iyi donanımlı uzmanlık laboratuvarları ile sınırlıdır. Hasta başı ya da sahada kullanıma yönelik olarak son zamanlarda batarya ile çalışan taşınabilir PCR cihazları geliştirilmiş olsa da yaygınlaşmamışlardır^(2,7,10).

Özellikle tanısal mikrobiyolojide klinik örneklerde olası bütün patojenlerin ya da olası tüm direnç elemanlarının tek aşamada saptanmasına yönelik girişimler polimeraz zincir reak-

siyonu (PCR) ve diğer nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin (NAT) öncesine dayanmaktadır. Ancak amplifikasyonsuz genellikle salt hibridizasyona dayalı bu yöntemlerin yaygın ve standart hale gelemeyişlerinin önündeki en büyük engel duyarlılıklarının düşük oluşu ve sonucun kısa sürede alınmayışdır. Amplifikasyon teknikleri ile birlikte duyarlılık sorununun üstesinden gelinmiştir. Bu aşamada ilk geliştirilen formatlar, NAT ve sonrasında sıvı ya da katı fazda hibridizasyona ya da enzim işaretli antijen-antikor testlerine dayanmakta olup gene doğal olarak yeterince hızlı sonuç alınan testler değildir. Bu bağlamda revers hibridizasyon olarak adlandırılan "line blot assay" formatında bazı ticari kitleler, hepatit C virusu, human papillomavirus genotip tayini ve hepatit B virusu ile insan bağışıklık eksikliği sendromu virusu (HIV)'nda ilaç direnci ile ilişkili olabilecek mutasyonların saptanması amacıyla kullanıma sunulmuştur ve bunlar halen kullanımdadır.

Fluoresans işaretli prob ve real time PCR ile birlikte, hem çoklu hem de hızlı saptama açısından büyük bir ilerleme sağlanmıştır. Son yıllarda karşı karşıya kalınan biyoterörist saldırılar da bu yöndeki çalışmalara ivme kazandırmıştır. Bu iki alanda yapılan modifikasyonlar ve real time PCR cihazlarının daha da geliştirilmesi bu amaca daha etkin bir biçimde ulaşılması yönünde olumlu gelişmelerdir. Özellikle bioterörist saldırıların erken saptanması için batarya ile çalışan, elle taşınabilir, gerek gerçek zamanlı, gerekse "son-nokta" okumalı PCR cihazları geliştirilmiş ve 30 dakika gibi bir süre içinde sonuç alınabilir hale gelmiştir. Çoklu saptama real time PCR platformlarında, erime eğrisi analizi ile de gerçekleştirilebilmektedir. Ancak real time PCR platformlarında dörtten fazla farklı prob kullanılamamaktadır.

Çoklu saptama açısından son yıllarda çeşitli tekniklerin kombinasyonundan ibaret pekçok yeni platform geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları: MIP (Molecular Inversion Probe assay), HyPlex, Luminex, Multicode, Proximity Ligation Assay olarak sıralanabilir (Tablo)^(1,6). Bu platformların kan, solunum yolları ve genital örneklerde çoklu patojen saptamada başarılı oldukları bildirilmiş ve bunlardan bazıları rutin kullanım için onaylanmıştır^(8,9).

Tablo. Çoklu saptamaya olanak veren nükleik asit test formatları.

• Multipleks PCR ve PCR ELISA	Dual priming oligo tabanlı multipleks PCR, ...
• Real time PCR	
• Proba dayalı sistemler	FISH
	PNA
	Line probe assay
	MIP (Molecular Inversion Probe assay)
	HyPlex
	Luminex
	Multicode
	Proximity Ligation Assay ...
• Array teknolojileri	Staphchip
	Nanochip
	Virochip
• Patogeneze yönelik	Konak ve etkenin ekspresyon profil analizleri
	İsteğe bağlı tasarım
• Son nokta → "Point of care test"ler ve "Lab-on-a-Chip"	Real time PCR'a dayalı
	Proba dayalı
	Bioluminsans
	Mikropompa

Binlerce probun kullanımına olanak veren "microarray"lerde probalar yeri belirlenebilir solid desteklere (sabit arrayler ya da çip) ya da yine, flow-sitometri ile yönlendirilerek tanımlanabilir mikroküreciklere (Luminex) tutturulmaktadır. Floresans işaretlerin kullanımı ve minyatürizasyon tekniklerindeki gelişmelerle birlikte gelecek açısından ümit veren bu platformlar çok çekicidirler. Örneğin bilinen tüm virüslere yönelik problemleri içeren Virochip sayesinde, son zamanlarda solunum yolları patojeni yeni virüsler ve yeni gastroenterit etkenleri tanımlanmıştır^(3,4). Ayrıca bu tip çiplerle tüm genom çapında genotiplendirmeler (Staphchip; genomotiplendirme) yapılabilmekte ve epidemiyolojik açıdan daha güvenilir ve daha kapsamlı bilgi edinilebilmesi mümkün olabilmektedir. Bu tip platformların gen ekspresyonlarının analizinde de kullanımları ile birlikte, gerek konak gerekse patojene yönelik "microarray"lerle patogeneze, ilaç ya da değişik koşulların, konak savunmasının patojenler üzerindeki etkileri geniş kapsamlı olarak araştırılabilir hale gelmiştir. Bilinen tüm insan transkriptlerini kapsayan çipler ya da ismarlama çipler ticari olarak bulunmaktadır. "Microarray" ve minyatürize sistemlerdeki tüm bu gelişmelerin varması arzu edilen son noktalar, bütün bir laboratuvarın çok küçük formatlara indirgenmesine olanak verecek "lab

on a chip" olarak adlandırılan sistemler ve hasta başında çok kısa süre içinde sonuç alınmasına olanak verecek "point of care" test formatları olacaktır. Ayrıca gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde, şu an için yüksek ilk yatırım maliyetleri ve deneyim gerektiren bu testlerin yaygın olarak kullanılma olanağı doğacaktır^(5,11).

Teşekkür: Katkılarından dolayı sayın, Rıza Durmaz, O. Şadi Yenen, Cafer Eroğlu, Orhan Cem Aktepe, Güven Külekçi, Emel Ekşioğlu, Derya Aydın'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Akhras MS, Unemo M, Thiyagarayan S et al: Connector inversion probe technology: a powerful one-primer multiplex DNA amplification system for numerous scientific applications, PLoS ONE 2007;19(2):e915.
2. Csako G: Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing, Clin Chim Acta 2006;363(1-2):6-31.
3. Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D: Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery, PLoS Pathog 2008;4(2):e1000011.
4. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM et al: Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections, PLoS Pathog 2007;3(5):e64.
5. Holland CA, Kiechle FL: Point-of-care molecular diagnostic systems-past, present and future, Curr Opin Microbiol 2005;8(5):504-9.
6. Kofoed K, Schneider UV, Scheel T, Andersen O, Eugen-Olsen J: Development and validation of a multiplex add-on assay for sepsis biomarkers using xMAP technology, Clin Chem 2006;52(7):1284-93.
7. Kubista M: Emerging real-time PCR applications, Drug Discovery World 2008;(Summer): 57-66.
8. Marente F, Yaghoubian S, Janeczko R: Principles of xTag™ respiratory panel assay (RVP assay), J Clin Virol 2007;40(Suppl 1):S31-5.
9. Nolte FS, Marshall DJ, Rasbery C et al: MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses, J Clin Microbiol 2007;45(9):2779-86.
10. Sloan LM: Real-time PCR in clinical microbiology: Verification, validation and contamination control, Clin Microbiol Lett 2007;29(12):87-95.
11. Yager P, Edwards T, Fu E et al: Microfluidic diagnostic technologies for global public health, Nature 2006;442(7101):412-8.
12. Zhang C, Xing D: Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends, Nucleic Acids Res 2007;35(13):4223-37.