

MANTAR ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

Nilgün Çerikçioğlu

Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İnvazif Mantar Enfeksiyonları (İME)

- **Bağışıklık sistemi** ↓
- **Morbidite-mortalite** ↑
- **(Erken) tanı güçlüğü**
 - ◆ Özgül olmayan/değişken belirtiler, bulgular
 - ◆ Tanı yöntemlerinde:
 - Duyarlılık
 - Özgüllük } yetersizlik
 - ◆ Uygun antifungal tedavide gecikme

NÜKLEİK ASİT SAPTANMASINA DAYALI TANI YÖNTEMLERİ

A) NÜKLEİK ASİT ÇOĞALTILMASINA DAYALI YÖNTEMLER

1988: Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PZR)

- Klinik materyalde mantar DNAsı saptanması
- Süreçte kritik noktalar:
 - ◆ Klinik materyalin türü ve alınış şekli
 - ◆ Materyalden DNA'nın ekstraksiyon protokolü
 - ◆ PZR'nin tasarımı
 - ◆ Amplikonun saptanması-tanımlanması
 - ◆ Uygun kontrollerin kullanımı (kontaminasyonun dışlanmasına yönelik)
 - ◆ Gerçek zamanlı (GZ-PZR) ile mantar DNA yükünün kantitasyonu

KLİNİK MATERYALİN SEÇİMİ-ÖRNEK ALINMASI

- Sağlıklı bireylerde mantar DNA sının bulunmadığı vücut bölgeleri ?



- Enfeksiyonun etkilediği bölgenin doğru seçimi
- Uygun örnek alım yöntemi

İME - KAN

- **Tam kan** : Fagositler
 - Fagosit olmuştan mantar yapıları/
 - Mantar DNA'sı
- **Serum-plazma** : Serbest mantar DNA'sı (uygun materyal)
- EDTA veya Na-sitrat ile alınmalı
- **Heparin - Taq polimeraz inhibitörü !**

İME-Bronko Alveolar Lavaj (BAL):

- Pulmoner enfeksiyon (uygun materyal)
- PZR sonuçları
 - Kolonizasyon ?
 - İnvazif enfeksiyon ?
- Negatif Prediktif Değer sıklıkla ↑
- İME-Balgam:
 - ◆ PZR sonuçları özgüllük↓

İME - Beyin Omurilik Sıvısı (BOS):

Seçilmiş olgularda uygun materyal

İME - Biyopsi:

Uygun materyal

- Parafinlenmiş doku için:



- Ksilol-etanol



- DNA ekstraksiyonu

- Formalinli doku için:

- ◆ (Formalin Taq polimeraz inhibitörü)

- Steril SF ile yıkama



- PZR

DNA EKSTRAKSİYONU:

- Kritik basamak
- İnsan DNA sı ↓
- Mantar DNA ↑
- Taq pmase inhibitörlerinin uzaklaştırılması
- Havadan mikrop sporları ile kontaminasyonun engellenmesi
- DNA nın verimli ekstraksiyonu ve saflaştırılması

- **Kan hücrelerinin lizisi**
 - ★ **Hipotonik tamponlar**
 - ★ **Proteinaz K ile sindirim**

Materyaldeki Mantar Hücrelerinden DNA'nın Salınımı:

- **Duvar parçalayıcı:**
 - ◆ Zimolaz (maya DNA sı içerebilir !)
 - ◆ Litikaz
 - ◆ P-1,3 glukanaz
- **Aspergillus için:**
 - ◆ NaOH ile kaynatma
 - ◆ Yüksek hızda santrifüj
 - ◆ Sıvı nitrojen ile tekrarlayan dondurma/çözme
- **(Fenol-kloroform yöntemi: başarılı fakat toksik ve zaman alıcı bir süreç)**

Ticari Kitler ile DNA Ektrasyonu:

- Duyarlılıkları değişkenlik gösterir
- Qiamp Doku kiti (Qiagen, Hilden, Almanya)
 - ◆ En uygun
 - ◆ Pahalı

KONTAMİNASYON:

- Panfungal primerler ile çalışılırken
- Havadaki mantar sporları
 - ★ (yalancı pozitiflik)
- Negatif kontrol
 - ★ Her bir 10 klinik örnek için:
 - 1 ekstraksiyon kontrolü
 - 1 PZR negatif kontrol

Önceki Çalışmalardan Taşınabilecek Amplikonların İnaktivasyonu *

- U.V. ile ışınlama
- Urasil-DNA-glikozilaz ile sindirim
- Ekstraksiyon... Farklı odalar
- Amplifikasyon..... Farklı malzeme
- Saptama

Otomatize İşlemlerle DNA Ekstraksiyonu:

- Çapraz kontaminasyonun engellenmesi
- Standardizasyonun artırılması
- MagNa Pure LC tekniği (tam otomatize, önerilen teknik)

MagNa Pure LC



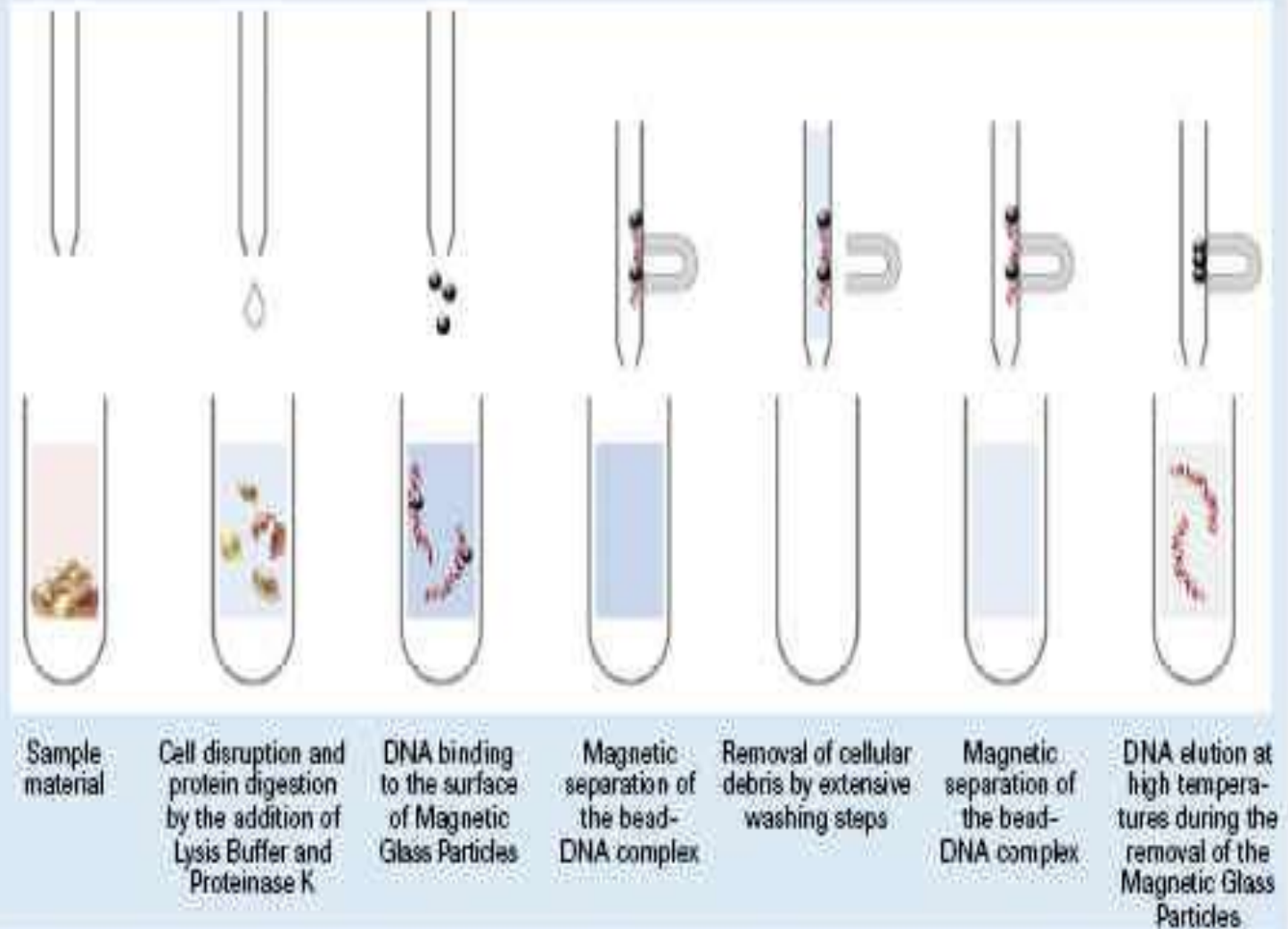


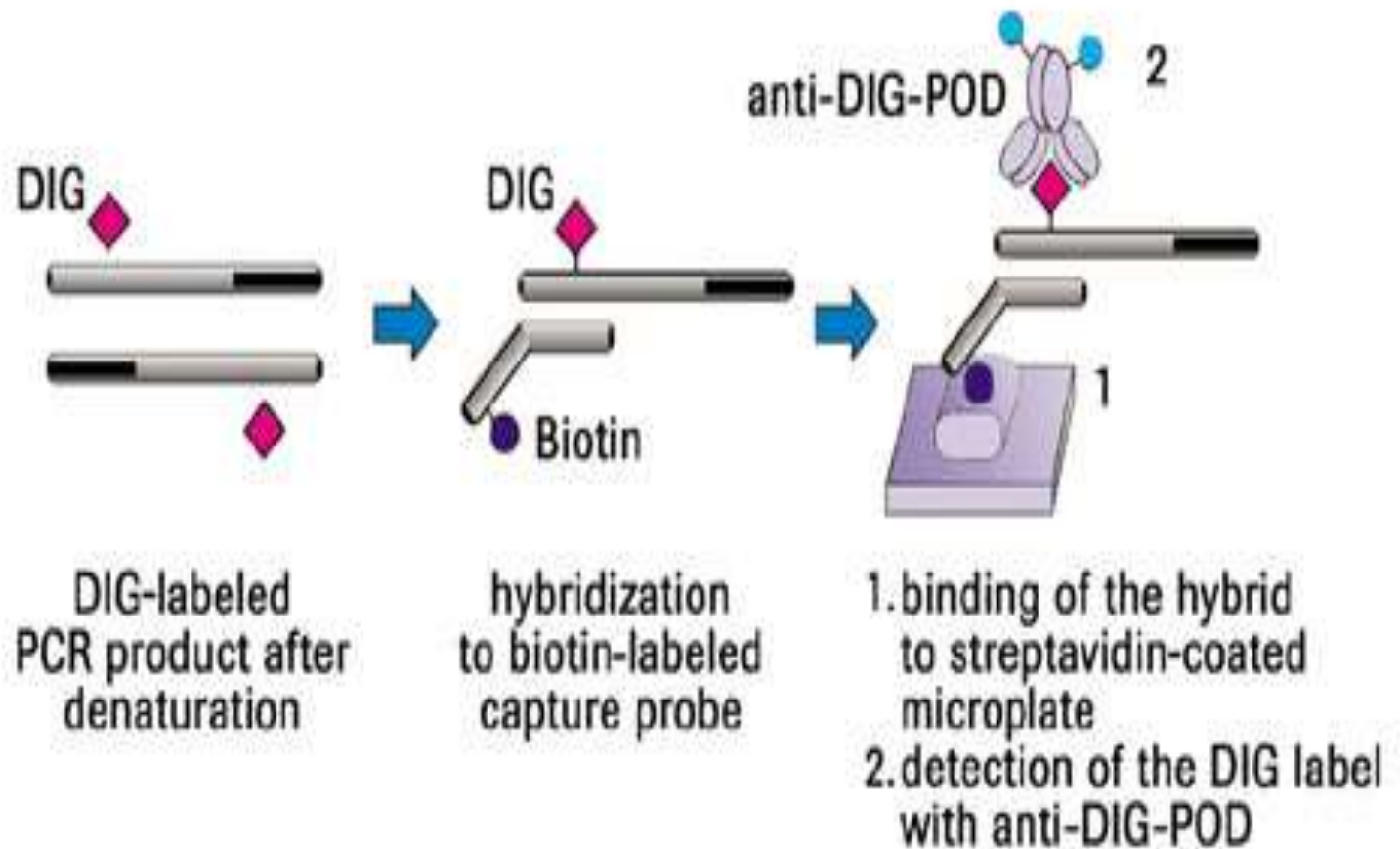
Figure 1: Principle of nucleic acid isolation performed automatically by the MagNA Pure Compact Instrument

AMPLİKONUN SAPTANMASI / TANIMLANMASI:

PZR-ELISA, Nested PZR

- Panfungal primer setleri ile büyük DNA bölgesinin çoğaltılması
- Türe özgül primerler ile türü tanımlayıcı DNA bölgesinin çoğaltılması

PZR-ELISA

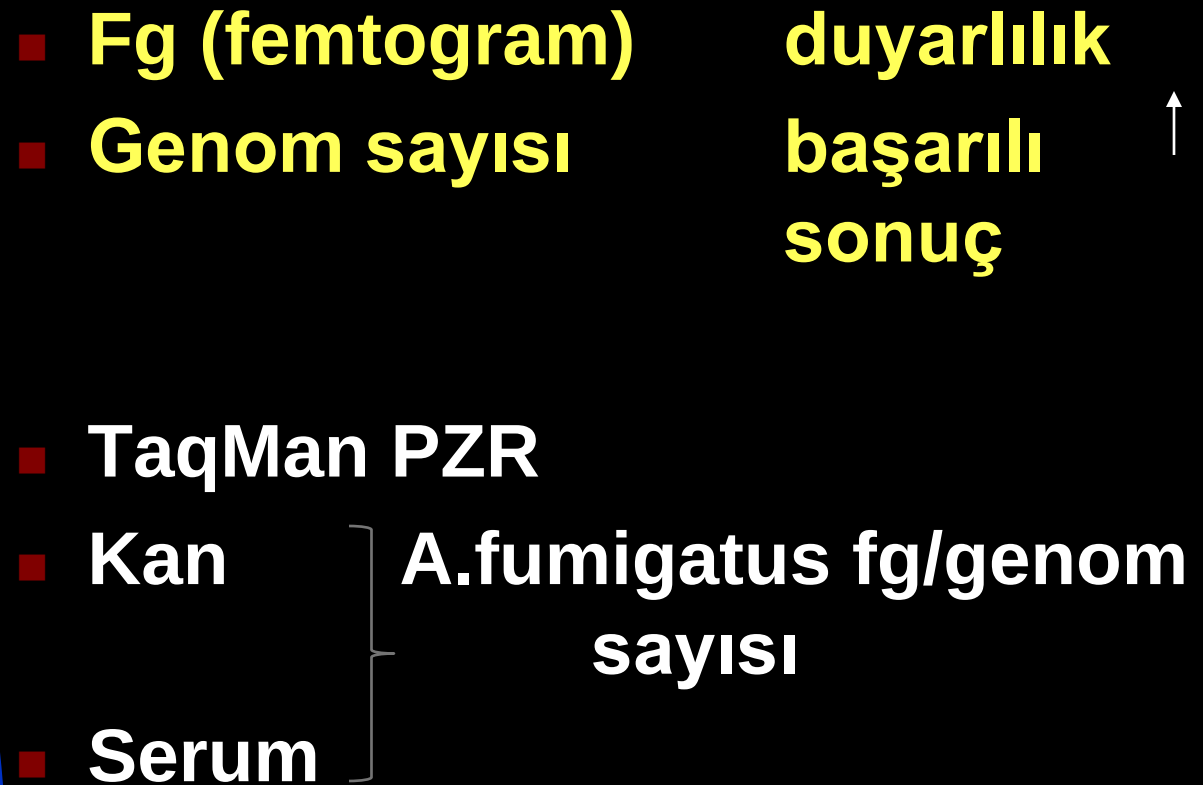


Mantar türünün tanımlanmasında:

- **Kültür duyarlılığı: % 51.6**
- **Hibridizasyon : % 77.4**
- **Amplikonların Dizi Analizi: % 90.3**

GZ-PZR :

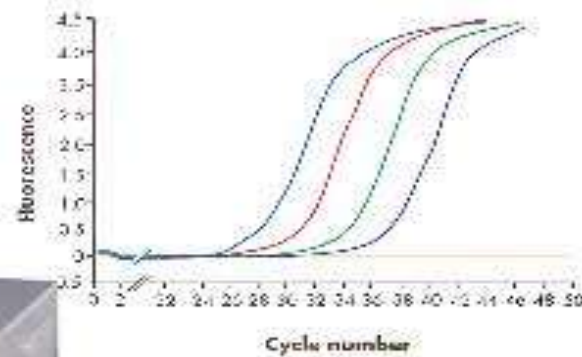
- Mantar DNA sınını:
- A. İn vitro hızlı amplifikasyonu
- B. DNA yükünün sayısal belirlenmesi
- Aspergillus fumigatus (Light cycler)
 - ◆ Kan : başarısız (kob/ml)
 - ◆ Kan dışı materyal: 5-10 kob/ml
- (Nested PCR duyarlılık ↑)

- **Fg (femtogram)**
 - **Genom sayısı**
 - **TaqMan PZR**
 - **Kan**
 - **Serum**
- duyarlılık**
başarılı
sonuç
- A.fumigatus fg/genom sayısı**
- 

- **TaqMan PZR**
- **Ribozomal DNA (türe özgül ITS2)**
- **Candida türleri**

- **Duyarlılık % 100**
- **Özgüllük % 97**

Real Time PCR



INFO

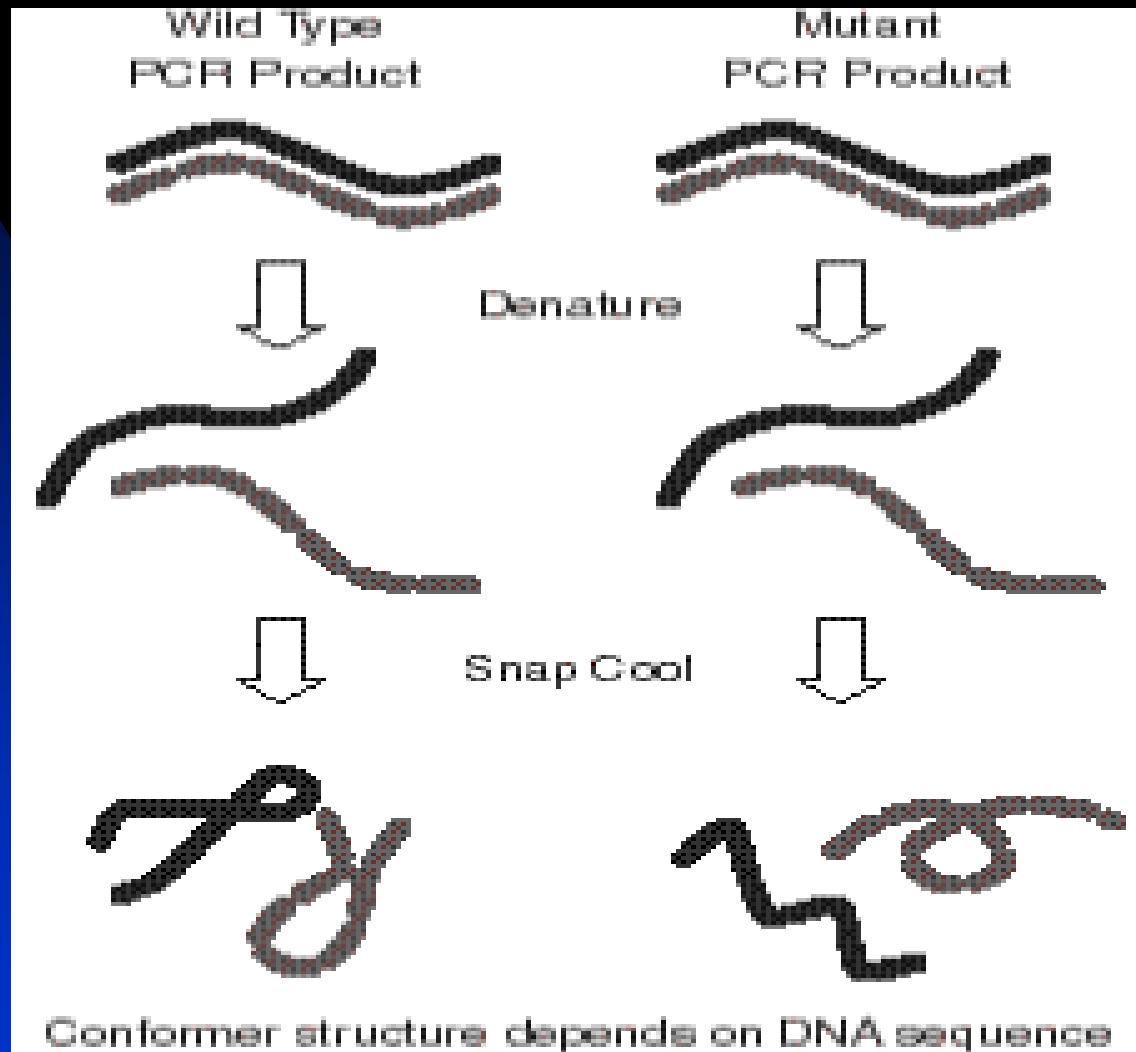
- **Nested PZR**
- **Seminested PZR**
 - ◆ Duyarlılık ↑
 - ◆ Özgüllük ↑
 - ◆ Başvurulabilir yöntemler

PZR-TEK İPLİKTEKİ KONFORMASYONAL POLİMORFİZM (TİKP)

- 18S rRNA-
- 197 taban çifti içeren parça----
PZR ile amplifikasyon
- Fragmanların denatürasyonu
- Farklı türlerde, minör
değişimlere bağlı katlanma
farklılıkları

PAGE'de farklı göç profilleri (TÜR *)

TiKP



PZR- TİKP

- Cins ayırımı
- Tür ayırımı
- Taksonomi
- Moleküler epidemiyoloji
- Antifungal direnç genlerinin saptanması

B) PZR DIŞI MOLEKÜLER SAPTAMA YÖNTEMLERİ

NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification:

- T7 RNA polimeraz, RNaz' lar
- Primerler
- İzotermal amplifikasyon***
- Termal denatürasyon (-)**
- Genomik DNA kontaminasyon (-)**
- Kopyalanan hedef RNA parçaları /
- oligonükleotid ile hibridizasyon

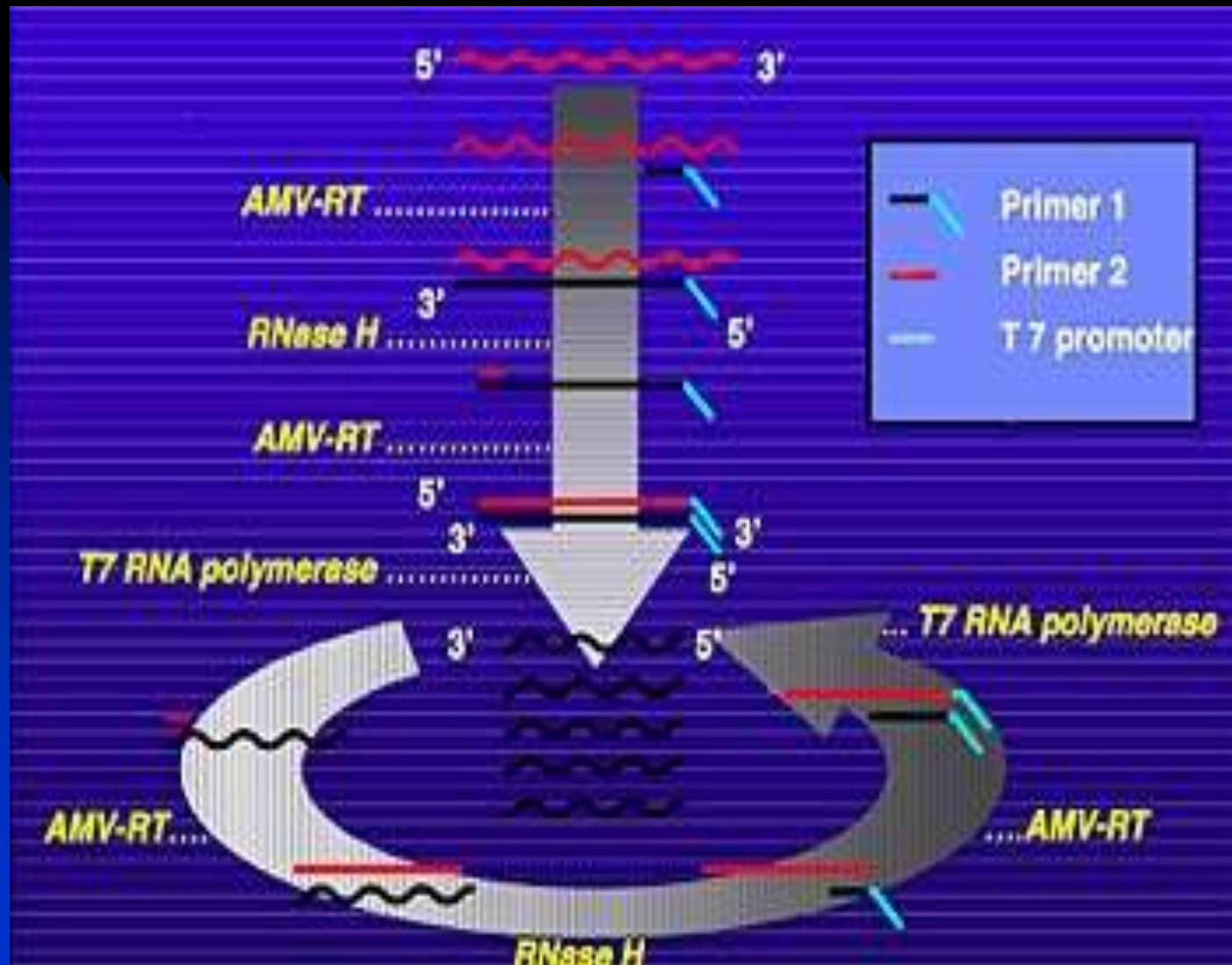


Lüminesans ölçümü****

NASBA

- 100 µlt.
- *A. fumigatus*' un kanda 1 kob/ml
- 6 saat

NASBA



İN-SİTU HİBRİDİZASYON

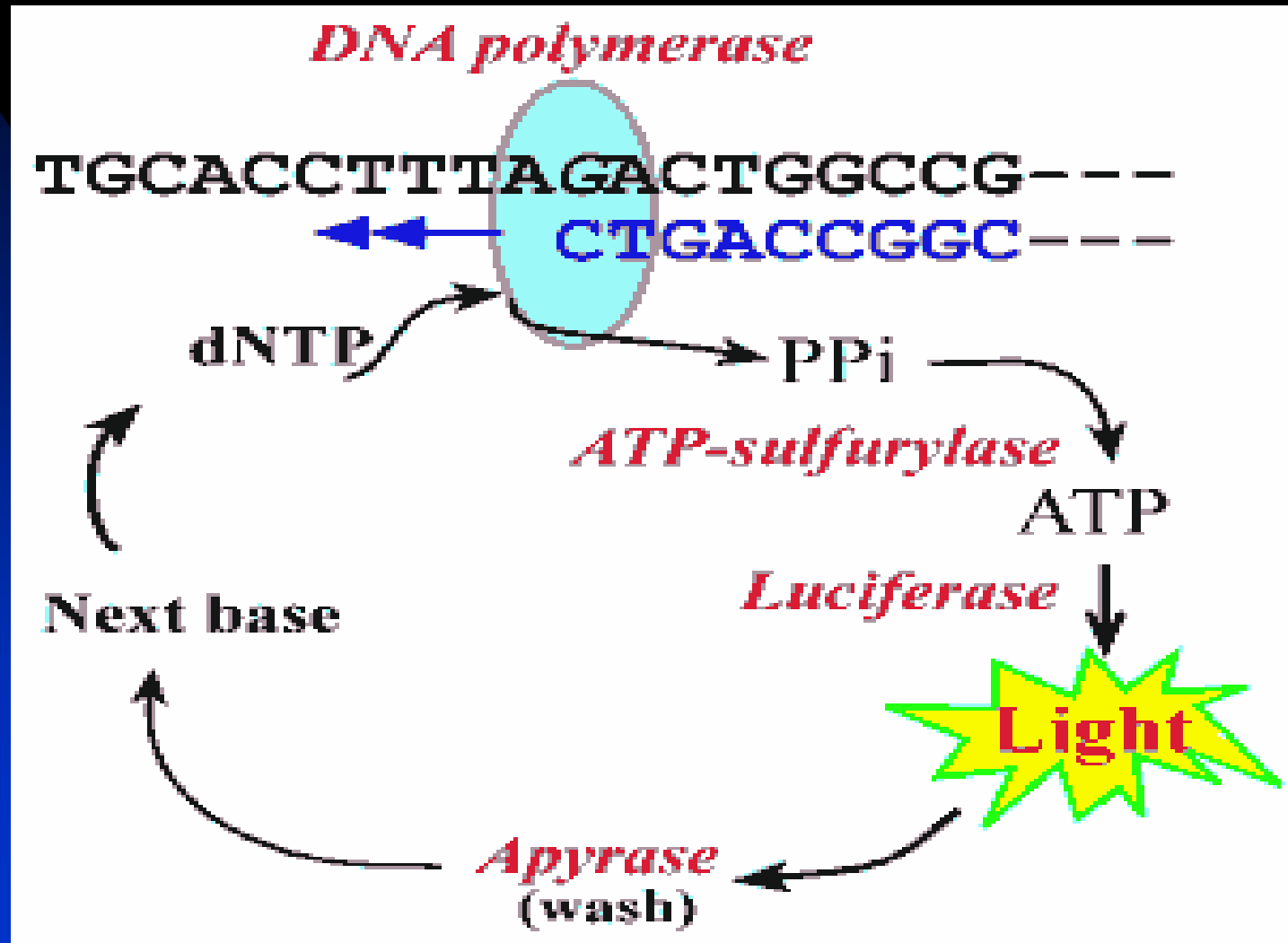
- Kan-Doku' da olası mantar DNA sı
 - ★ 18 S r RNA geni
- Floresein işaretli homolog oligonükleotidler ile hibridizasyon
- 3 kob/ml. (kan).
- Üremeli KKŞ'de 150 dk.
tür düzeyinde saptama
- **Dezavantaj:** *herbir tür* için ayrı örnek kullanım gerekliliği

PİROSEKANSLAMA

DNA'daki nükleotidlerin sıralamasını saptar.

- 4 çift enzimatik reaksiyon
- (DNA polimeraz, ATP sülfirilaz, Apiraz, **ATP lüsiferaz..**)
- **Biyolüminometrik DNA sekanslama*****
- İnvazif asperjilloz vd...
Duyarlılık, özgüllük

pirosekanslama



İNVAZİF..KANDİDİYAZ IN MOLEKÜLER TANISI

- En sık izole edilen fungal (fırsatçı) patojen
- *Kan kültürü altın standard (kandidemi)*
- Kronik dissemine kandidiyaz'da kanda maya miktarı ↓
- Duyarlılık ↓

- **1990, Buchman**
 - ◆ **Lanosterol-14 α -demetilaz**
 - ★ **geni $\rightarrow$ PZR**
 - ★ **(100 maya/ml.)**
 - ◆ **Nested PZR**
 - ★ **(2 maya/ml.)**
 - ★ **(kısıtlı tür)**

- **Genellikle tek kopyalı gen bölgeleri:**

- Isı şok proteini geni

- Aktin geni

- Mitokondri genleri

- Ribozomal DNA

- ★ Duyarlılık, özgüllük



İNVAZİF ASPERJİLLOZUN MOLEKÜLER TANISI

- Çok kopyalı gen bölgeleri ile PZR:
- Topoizomeras II geni (nested PZR)
 - ★ 18 S r DNA
 - ★ 28 S r DNA bölgelerinde
 - ITS 1-4 yüksek değişkenlikli gen bölgeleri
- Mitokondriyal genler
- Multipleks PZR başarı ↑

- **BAL'da**
- ↑ negatif prediktif değer
- Değişken pozitif prediktif değer
- (invazyon-kolonizasyon???)

- **Transplantasyon hastalarında önemli olabilir.**
- *(sonuçlar sonradan gelişen invazif asperjilloz ile uyumlu)*
- **Standardizasyon ?**

DİĞER MANTAR ENFEKSİYONLARININ MOLEKULER TANISI

Zikomikoz etkenleri

- ◆ Klinik materyalden üretilmesi zor
- ◆ 18 Sr DNA
- ◆ 28 Sr DNA ya yönelik PZR

Scedosporium türleri

- ◆ Solunum yolu enfeksiyonları
- ◆ ITS gen bölgesine yönelik PZR

Fusarium türleri

- **Kornea kazıntıları ile PZR**
- **(kültüre göre duyarlılık YÜKSEK)**
 - ◆ Operasyon sonrası dönem
 - ◆ AIDS
 - ◆ Diabetes Mellitus

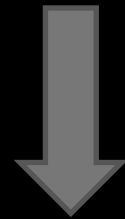
SONUÇ:

Hızlı moleküler tanı:

*"YAKLAŞAN TEHLİKE" durumundaki mantar hastalıkları için :

↑ (+) prediktif (kestirim) değeri

- *"YAKIN TEHLİKEDE OLMAYAN "olgularda:
 - toksik antifungallerin kullanımının engellenmesi
- *Karmaşık işlemler— Pahalılık.....



• **KÜLTÜR-SEROLOJİ** ★★