

# Akdeniz Benekli Ateşi'nin Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yrd. Doç. Dr. Figen KULOĞLU

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne

Riketsiyaların saptanması ve tanımlanmasında (identificati-on) polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayanan moleküler yöntemlerin kullanımı 1989 sonrasında gözlenmektedir (1, 2, 3, 4).

İlk kez 1985'de Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilen PZR, in vitro hedef DNA'nın çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir tekniktir (5). PZR'da her bir reaksiyon üç basamaktan oluşmaktadır:

1. Denatürasyon: Çoğaltılacak çift iplikçikli kaynak DNA'nın 90-95°C'e ısıtılarak birbirinden ayrılmasıdır.

2. Hibridizasyon (annealing): Sentetik oligonükleotid primerlerin uygun sıcaklıkta (45-55°C) kaynak DNA'nın 3' uçlarına bağlanmasıdır. Deney için optimal ısı  $T=[4(nG+nC)+2(nA+nT)]-5$  formülü ile saptanabilir; n primerdeki baz sayısıdır. Ortamda tek iplikçikli DNA, iki oligonükleotid primer (15-30 baz uzunluğunda), yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi ve dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bulunmalıdır.

3. Amplifikasyon (extension): Taq DNA polimeraz, ortamdaki dNTP'leri kullanarak 70-75°C'de primerlerden başlayarak yeni zinciri oluşturur. Bu polimerizasyon 5'→3' yönünde gerçekleşir. Saniyede 75 nükleotid sentezlenebilmektedir. Taq DNA polimeraz enziminin aktivitesi için ortamda serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç vardır.

Riketsiyaların saptanması için antibiyotik tedavisi öncesi kan, deri biyopsi örnekleri (özellikle "tache noir" en çok bakteri bulunan örnek) önerilmektedir (6). Eğer kan örneği çalışılacaksa EDTA veya sodyum sitratlı kanın "buffy coat" tabakası önerilmekte; heparin PZR'i inhibe etmektedir.

DNA'nın ayrılmasında (extraction) SDS + proteinaz K+ fenol kloroform işlemi veya "QIAmp Tissue kit" (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılabilir (7,8).

Reaksiyon karışımı toplam 100 µl'lik bir solüsyon olacak şekilde 1.25 ünite AmpliTaq DNA polimeraz (Perkin-Elmer Cetus), 2 µl kaynak DNA, 10 pmol sentetik primerler, 200 µM her bir dNTP (Boehringer Mannheim) ve 6 µl of a 25 mM solution of MgCl<sub>2</sub> (1xTag buffer içinde) içerir (7). Amplifikasyon DNA thermal cycler cihazı ile şu koşullarda uygulanmalıdır: Önce 95°C'de 3 dakikalık bir denatürasyon, daha sonra 35 kez 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 46°C'de 30 saniye annealing (primerlerin bağlanması), 65°C'de 1 dakika extension (yeni DNA sentezi) ve en sonunda PZR ürünlerinin tam uzaması için 72°C'de 7 dakika beklenerek tamamlanır (7).

PZR'de kullanılacak kaynak DNA'nın saf olması, sentetik primerlerin birbirleri ile baz çiftleri oluşturmayacak şekilde seçilmesi amplifikasyon verimini artırır. Her PZR deneyi daha önceden pozitif olduğu saptanmış bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol içermelidir.

PZR, tek bir molekül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olması

nın engellenmesi gerekmektedir.

Kontaminasyon, DNA eklenmemiş reaksiyon karışımından oluşabilecek bir negatif kontrol kullanılarak denetlenir. Kontaminasyon, daha önceki PZR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücre materyelden kaynaklanabilir.

PZR deneylerinde dikkat edilmesi gereken noktalar:

1. Mümkünse uv ışıkla donatılmış "laminar flow hood" içinde yapılmalıdır.

2. Hood içinde yalnızca PZR için kullanılan mikrotüpler; tek kullanımlık eldiven ve pipetler bulundurulmalıdır.

3. Otomatik pipetler çok sık kontaminasyon kaynağı olduklarından "positive-displacement" pipetler ve filtreli pipet uçları kullanılmalıdır.

4. Deneye başlarken temiz bir eldiven giyilmeli, kirlendiği düşünüldüğünde değiştirilmelidir.

5. Sarf malzemesini herkes kendisi için küçük hacimlerde hazırlamalıdır.

6. Hazırlarken tüm malzemenin yeni ve steril olmasına dikkat edilmelidir. Bu malzemeler başka amaçlarla kullanmamalıdır.

7. Sarf malzemelerini taşıyan mikrotüpler açılmadan önce kısaca santrifüjlenmelidir; bu işlem eldivenlerin ve pipetlerin kontaminasyonuna engel olacaktır.

8. Reaksiyon tüplerine en son DNA eklenmelidir.

9. Reaksiyon tüpüne DNA eklenirken hava kabarcıkları oluşturmamaya dikkat edilmelidir.

10. DNA örneği pozitif kontrol mikrotüpüne laboratuvarın uzak bir köşesinde eklenmelidir.

11. Deneyde DNA dışında tüm PZR komponentlerini içeren bir negatif kontrol olmalıdır. Bu negatif kontrol tüm PZR reaksiyonu yapıldıktan sonra yapılmalıdır.

Sentetik oligonükleotid primerlerden bahsederken bazı kısaltmalar kullanılmaktadır. Örnek olarak RpCS.877p ve RpCS.1258n, nükleotid dizisinin elde edildiği cins ve türün baş harfleri (Rp: *R. prowazekii*), citrate synthase (CS) geninin 877-1258. nükleotidleri arasındaki bölgeyi kodlamaktadır. Polimerizasyon 5'→3' yönünde olduğundan pozitif (p) zincirin 877. nükleotidinden başlar, negatif zincirin 1258. nükleotidinde sonlanır. Rr190.70p ve Rr190.602n, *R. rickettsii*'den elde edilmiştir; 190kDa'luk antijeni kodlayan genin 70-602. nükleotidlerinin arasını çoğaltır (2).

Otuz siklustan oluşan bir deney tamamlandığında bir DNA molekülünden  $2^{30}=1.02 \times 10^9$  kopya elde edilmiş olur. PZR ile çoğaltılan DNA segmenti bir restriksiyon enzimi ile kesilebilir. Oluşan DNA parçaları agaroz veya akrilamid jel elektroforezinde ayrılıp, etidyum bromid ile boyanarak direkt olarak ultraviyole ışık altında incelenebilir (2, 3). PZR ile çoğaltılan DNA segmentinin dizi analizi de yapılabilir (7, 8).

*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. japonica*, *R. typhi*, *R. prowazekii*, *R. africae*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. slovacca*, *O. tsutsugamushi*

DNA'sı hastaların periferik kan, "buffy coat", plazma ve doku örneklerinden PZR ile çoğaltılmıştır (amplifiye edilmiştir) (9). Bütün patojenik riketsiyalar için 17-kDa protein geni ana hedefdir. Citrate syntase, 16S rRNA ve OmpA genleri de amplifiye edilmiş; PZR ürünlerinin AluI ve XbaI ile "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) analizi veya dizi analizi ile *Rickettsia* türleri tanımlanmıştır (9).

Hücre kültür yöntemlerinin kullanılması ile pek çok laboratuvarında riketsiyalar üretilmekte ve moleküler yöntemler ile bakteriler tanımlanmaktadır. PZR ile genus spesifik genlerin (17-kDa protein, citrate syntase veya OmpB genleri) veya Benekli Ateş Grubuna (BAG) spesifik OmpA geninin amplifikasyonu ve PZR ürünlerinin RFLP analizi veya DNA dizi analizi ile üretilen riketsiyalar tanımlanmaktadır (9).

BAG riketsiyaların sayısı, geliştirilmiş hücre kültür yöntemleri ve moleküler yöntemler sonrasında artış göstermiştir. DNA dizi analizinin kullanımı ise bu bakteriler aralarındaki genotipik ilişkilerin araştırılarak filogenetik analizlerin yapılabilmesini sağlamıştır.

### KAYNAKLAR

1. Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detecton of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin. Microbiol* 1989; 27: 2866-8.
2. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol* 1991; 173: 1576-89.
3. Eremeeva M, Yu X, Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J. Clin. Microbiol* 1994; 32: 803-10.
4. Williams WJ, Radulovic S, Dasch GA, et al. Identification of *Rickettsia conorii* infection by polymerase chain reaction in a soldier returning from Somalia. *CID* 1994; 19: 93-9.
5. Dilsiz N. Moleküler Biyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık, 2004; 61-3.
6. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol Infect* 2004; 10: 1108-32.
7. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1998; 48: 839-49.
8. Raoult D, Fournier PE, Fenollar F et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-saharan Africa. *N Engl J Med* 2001; 344: 1504-10.
9. Walker DH, Bouyer DH. *Rickettsia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1005-14.