

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

Dr. Gülnur TARHAN

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Tüberküloz Referans Ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve doğru tedavi stratejilerinin belirlenmesinde; klinik belirtiler, patolojik ve histolojik bulguların yanında klinik örneklerden hastalık etkeninin izolasyonu, identifikasyonu ve etkene ait antijenik yapıların ortaya konulması büyük önem taşır.

Günümüzde pek çok enfeksiyon hastalığının mikrobiyolojik tanısında mikroskopi ve kültür en çok başvurulan yöntemlerdir. Mikroskopi yönteminin duyarlılığı düşük olup, kesin tanı için destekleyici testlere gereksinim vardır. Kültür ile bazı hastalıkların tanısı %100'e varan bir doğrulukta yapılmasına rağmen, Mycobacterium tuberculosis gibi geç üreyen bazı bakteri ve mantar türleri, kültürü yapılamayan veya çok zor olan viruslar ve kolay üretilen bakteriler söz konusu olduğunda; hasta örneklerinin antibiyotik kullanımını başladıktan sonra alınması ya da örneklerin uygun olmayan koşullarda laboratuvara gönderilmesi durumunda kültür tekniklerinin yetersiz kaldığı bilinmektedir.

Kültür ve mikroskopi yöntemine destekleyici olarak rutin kullanıma girmiş; radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA) ve enzyim immunoassay (EIA) gibi, spesifik antijen-antikor taramaya dayalı immunolojik tabanlı testler ile bir çok enfeksiyon etkeninin tanısında oldukça başarılı

sonuçlar alınmaktadır. Ancak bu testler ile düşük titrede antijenemi, antikor yanıtı veya çapraz reaksiyonlar nedeni ile kesin ve doğru tanı her zaman mümkün olmamaktadır (Tablo 1).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında kaydedilen gelişmeler; özellikle mikroskopi ve kültür gibi standart yöntemler ile tanısı konulamayan veya çok güç olan bir çok enfeksiyon etkeninin tanımlanmasında önemli bir gelişme sağlamıştır.

Bu gelişmeler doğrultusunda; biyoteknolojik yöntemler oldukça yararlı olmuş, konvansiyonel tekniklerin boşluklarını doldurmaya ve gidermeye başlamıştır. Günümüzde bu yöntemler kullanılarak çok kısa sürede etkenin klinik örneklerden saptanması, in vitro koşullarda çoğaltılması ve tanısına ilaveten; tiplendirilmesi, tür tayini, antimikrobiyal ilaçlara direnç durumunun belirlenmesi ve epidemiyolojik araştırmalar ile enfeksiyon kaynaklarının ortaya çıkarılması mümkün hale gelmiştir.

Bugün nükleik asit amplifikasyon teknikleri kullanılarak pek çok enfeksiyon etkeninin tanısı güvenli bir şekilde ortaya konulabilmektedir. Bunlar arasında bazı önemli patojenlerin listesi Tablo 2'de verilmiş olup, her geçen gün bu listeye yeni patojenler ilave olmaktadır.

Tablo 1. Mikrobiyolojik tanıda konvansiyonel yöntemlerde karşılaşılan bazı problemler

Yöntem	problem	örnekler
Mikroskopi		
Aside rezistan boyama	Düşük duyarlılık	M.tuberculosis balgam mikroskopisi
Hematoksilen-Eozin	İnvaziv	HSV beyin biopsi
Boyama		
Direk floresan antikor tekniği	Yalancı pozitif	Legionella balgam mikroskopisi
Kültür		
	Az sayıda canlı mikroorganizma	C.trachomatis
	Kültürün yapılamaması	T.whipelli,HCV
	Biyolojik tehlike	Hantavirus,Coxiella
	Zor üreyen mikroorganizma	Haemophilus ducreyii
Antijen tanı testleri		
	Yalancı pozitif	C.trachomatis için EIA
	Uzun süreli antijen salınımı	İdrar örneklerinde Legionella tanısı
	Tanı antijeni kısıtlılığı	Serumda HIV p 24 antijen yetersizliği
Seroloji		
	İmmünkomprime konağın negatif olması	PPD anenjisi
	Yorum karmaşası	Histoplasmosis
	Hastalık ile zayıf ilişki	EBV VCA IgG
	Yüksek titre	Lyme hastalığı
	Çapraz Reaksiyon	Otoimmun hastalık
	Spesifik olmayan sonuçlar	Heterofil antikor, RPR

Klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait nükleik asitlerin (DNA / RNA) veya spesifik sekanslarının in vitro koşullarda enzimatik olarak çoğaltılması (amplifikasyonu) temeline dayanan, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri;

1. Hedef amplifikasyon

2. Prob amplifikasyon

3. Sinyal amplifikasyon

olmak üzere üç ana başlık altında toplanmıştır (Tablo 3).

HEDEF AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

1985 yılında Kary Mullis tarafından bulunan ve kendisine Nobel ödülü kazandıran bu teknik, hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde taklit edilmesi esasına dayanır. PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için reaksiyon karışımında çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA'

da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp, ona bağlanacak olan DNA primerleri; primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz; sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar; polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle tris ve KCl) ve enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg⁺⁺ iyonları gerekir.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu amaçla thermocycler adı verilen ısı döngü cihazı kullanılır. İlk basamak denatürasyondur. 94 °C' ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50 ile 70 °C arasında

Tablo 2. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ile saptanan enfeksiyon etkenleri

NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ İLE SAPTANAN ENFEKSİYON ETKENLERİ		
Bakteriyel Patojenler	B.anthraxis B.pertussis Cl. difficile Chl.trachomatis C.diphtheriae Campylobacter sp. E.coli (ETEC) E.coli (EHEC) Erlichia sp. H.influenzae Leptospira sp. Listeria monocytogenes Legionella pneumophila M.tuberculosis M.leprae M.avium	Mycoplasma sp. M.fermentas N.meningitidis N.gonorrhoeae S.typhimurium Shigella sp. S.aureus Grup A streptococcus Grup B streptococcus Streptococcus pneumoniae T.pallidum V.cholerae U.urealyticum Y.pestis Y.enterocolitica
Viral Patojenler	Herpes simplex virus tip1 ve 11 Epstein- Barr virus Cytomegalovirus Varicella -zoster virus İnsan herpes viruslar 6 ve 7 İnsan JC virus İnsan papilloma virus Hepatit C virus Enteroviruslar Hepatit B virus	HIV-1 ve HIV -2 HTLV -1 ve HTLV -2 HBLV İnfluenza virus İnsan parvovirus B 19 İnsan adenovirus İnsan papilloma virusu Rubella virus Rhinovirus Hepatit A virus
Fungal patojenler	Blastomyces dermatidis Candida albicans Coccidioides immitis Cryptococcus neoformans	Histoplasma capsulatum Pneumocystis carinii Trichosporon beigellii
Protozoal patojenler	Babesia bigemina Babesia bovis Babesia microti Entamoeba histolytica Giardia intestinalis Leishmanisa sp.	Plasmodium falciparum Naegleria fowleri Toxoplasma gondii Trichomonas vaginalis Trypanosoma sp.

değişir. Üçüncü basamak polimerizasyon veya sentez aşamasıdır. Karşım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72 °C' ye getirildiğinde, primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri 3' ucuna kalıp DNA' ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlama iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılmış olur. Çoğaltılan DNA parçalarının gösterilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezidir. Elektroforez ile boylarına göre ayrıntılan DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışığı altında izlenir.

PCR yöntemi ile ortamda birkaç DNA kopyası bile olsa, hedef gen birkaç saat içinde 106 kat arttırılabilmektedir. Bu nedenle kısa sürede sonuç vermesi bakımından diğer tanı yöntemlerine göre daha üstündür. Ancak aşın duyarlı bir yöntem olması nedeni ile kontaminasyona bağlı yanlış

pozitiflikler veya çeşitli ekstraksiyon aşamalarındaki hatalara bağlı olarak yanlış negatifliğe açık bir yöntemdir. Bu nedenle işlem sırasındaki tüm aşamaların standardize edilmesi ve uygulamaların buna göre yapılması oldukça önem taşır. PCR yöntemi günümüzde;

1. **Kültürünün yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde,**
2. **Toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında,**
3. **Antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde,**
4. **Mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında,**
5. **Gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında,**
6. **Epidemiyolojik araştırmalarda,**

yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 3. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

MOLEKÜLER YÖNTEMLER	KULLANILAN TİCARİ KİTLER
Hedef amplifikasyon	
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	Roche, Branchburg, NJ Johnson&Johnson (formerly Kodak) Abbott, Abbott Park, IL
- Transkripsiyon bazlı amplifikasyon	
Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)	Organon Teknika, Durham, NC Cangene Corp, Toronto, Ontario
Self sustaining sequence replication (3 SR)	Igen, Rockville, MD Baxter, Sacramento, CA
Transcription mediated amplification (TMA)	Gen -Probe, San Diego, CA
Strand displacement amplification (SDA)	Becton -Dickson, Sparks, MD
Prob amplifikasyon	
Ligase chain reaction (LCR)	Abbott, Abbott Park, IL

2. TRANSKRİPSİYON BAZLI AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Transkripsiyona Bağlı Çoğaltma (Transcription Mediated Amplification - TMA -)

TMA izotermal bir amplifikasyon yöntemi olup, bu yöntemle çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA'dır. Mekanizma olarak, ribozomal RNA'nın reverse transkriptaz enzimi ile DNA kopyası çıkarılır. Reverse transcriptase'ın RNaz-H aktivitesi sentez sırasında RNA'yı ortadan kaldırır. Bu sırada kullanılan primerin 5' ucunda bulunan bir promotor dizi elde edilen ürünün içerisine yerleştirilmiş olur. Bu tek zincirli DNA'yı reverse transcriptase enzimi aynı zamanda DNA polimeraz aktivitesi gösterdiği için, ortama konulan ikinci primeri kullanarak, çift zincirli DNA'dan çok sayıda tek zincirli RNA kopyası yapılır. Bu RNA zincirlerinin bir kısmı reverse transcriptase'ı kalıp olarak kullanır ve tekrar DNA yapımı ile tepkimeler zincirleme şekilde devam eder ve ürün çoğaltılmış olur. Çoğaltılan RNA genellikle hibridizasyon korunma deneyi adı verilen bir yöntemle saptanır. Bu amaçla akridinylum ester ile işaretli DNA problemleri kullanılır. Prob çoğaltma ürününe eklenir ve hibridizasyon için bir süre beklenir. Sonra ortama zayıf bir asit eklenerek bağlanmayan problemler üzerindeki akridinylum ester parçalanması sağlanır. Ortamda ajana özgül bir çoğaltma ürünü yoksa, prob moleküllerinin hepsi serbest kalır ve akridinylum esterinin tamamı parçalanır. Çoğaltma ürünü varlığında ise problemlere bağlı akridinylum

esteri hibridizasyon sırasında iki DNA zinciri arasında kalarak zayıf asidin parçalanma etkisinden korunur. Daha sonra kemilüminometrede akridinylum parçalanarak açığa çıkan ışık kantitatif olarak ölçülür.

Bu yöntemin en önemli özelliğinden biri tüm tepkimenin aynı tüp içerisinde gerçekleştirilmesi ve böylece kontaminasyon riskinin az olmasıdır. Ayrıca thermocycler (ısı döngü cihazı) gerektirmemesi ve kısa 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmesi testin diğer bir avantajıdır.

Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)

NASBA, RNA'nın saptanmasına yönelik transkripsiyona dayalı bir sekans amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde aynı ısıda, bir çok enzim ve primer kullanılır. İzotermal bir işlem olduğu için amplifikasyon sırasında thermocycler kullanılmamasına gerek yoktur. Hedef RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi sırasında kullanılan primerlerin bir ucu hedefe spesifik sekanslar içerirken, diğer ucu T7 fajı RNA polimerazı için promotor görevi yapar. Reverse transcriptase enzimi ile T7 P 3' ucundan başlayan bir cDNA sentezlenir. RNA / DNA hibridinin RNA komponenti RNase H ile degrade edilir. Primer P2 cDNA'nın 5' ucuna bağlanır. Reverse transkriptase aktivitesi ile çift zincirli DNA kalıbı oluşur. Bu kalıp T7 RNA polimeraz promotor sekanslarında tanınır; böylece hedef RNA sekanslarının bir çok kopyası çıkarılmış olur. Sonuç oligonükleotid proba hibridizasyon ve lüminesan ölçülmesi ile elde edilir.

PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında, diğer amplifikasyon yöntemlerinden daha hızlı olması ve kısa sürede uygulanması ile önem kazanmıştır. Bu yöntemle özellikle HIV-1, Mikobakteri ve HCV tanısında oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır.

Self Sustaining Sequence Replication (3SR)

Özellikle HIV 'nin tanısında kullanılan bu yöntemde, prensip olarak retrovirus çoğalması taklit edilmektedir. İzotermal bir işlemdir. Test sırasında reverse transkriptase (AMV-RT), faj kökenli RNA polimeraz (T7 RNA polimeraz) ve E.coli Rnaz- H enzimi olmak üzere üç farklı enzim kullanılır. Bu yöntemde kalıp RNA üzerindeki hedef diziler komplementeri olan primer (primer I) ile hibritlenir. Reverse transkriptase enzimi ile karşı zincir sentezlettilerle RNA/c DNA heterodubleksi elde edilir. Daha sonra RnAZ- H ile DNA / RNA heterodubleksindeki RNA parçalanarak c DNA elde edilir. cDNA promotor bölgesine bağlanan primer (primer II), RNA polimeraz enzimi yardımı ile uzatılarak ds cDNA üretilir. ds cDNA hedef RNA'nın homoloğudur. RnAZ-H ile ds c DNA denatüre edilerek, tek zincirli RNA elde edilir. Thermocycler gerektirmemesi, kısa sürede sonuç vermesi ve direkt RNA amplifikasyonu yapabilmesi bakımından viral enfeksiyonların tanısında oldukça avantajlıdır.

Strand Displacement Amplification (SDA)

PZR 'a benzeyen bu yöntem E.coli DNA polimerazı Klenow parçasının çift zincirli DNA üzerinde kesilmiş tek zincir varlığında, bu noktadan başlayarak, bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilmeye yeteneğine dayanır. Bütün tepkime 370 C de yürütülür ve primer bağlanması, kesilme, zincir ayrılması ve DNA sentezi PCR da olduğu gibi özgül bir bölge geometrik olarak çoğaltılır. Yöntemin özgülüğü yine sadece aranan etkene özgü DNA dizilerini tanıyacak primerlerin kullanılmasına bağlıdır.

PROB AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Ligase Chain Reaction (LCR)

İlk defa 1989 yılında tanımlanan bu teknik PCR yönteminde olduğu gibi üç temel aşamadan meydana gelir. İlk aşamada saptanmak istenen nükleik aside özgül hedef DNA bölgesi ve işaretli problemler karşıtarılarak 94 °C' ye ısıtılır. Çift sarmallı DNA'nın tek sarmalları ayrılmasından sonra karışım 40 - 70 °C' ye kadar soğutulur ve problemlerin hedef DNA' ya bağlanması ve hibridizasyonu sağlanır. Hibridize olmuş problemler hedefe, birbirlerine çok yakın ve sadece bir yada iki nükleotid

boşluk kalacak şekilde bağlanır. Daha sonra bu boşluklar polimeraz enzimi ile doldurulur. Bu aşamadan sonra ligaz problemler birbirine kovalent bağlar ile bağlanır ve hedef tamamlayıcı baz dizilerinden oluşan bir amplifikasyon ürünü meydana gelir. Oluşan amplifikasyon ürünü ve ligaz ile birleştirilmiş molekül daha sonraki amplifikasyon aşamalarında hedef olarak kullanılır. Aynı işlemler tekrarlanarak, ligasyon ürününün miktarı logaritmik olarak artırılır. LCR 'da amplifikasyon sonrası analiz, elektroforez işlemine gerek kalmadan genelde mikropartikül enzim immunoassay tekniği kullanılarak yapılır. Son yıllarda PCR' a alternatif olarak kullanılan bu yöntem ile PCR'da sık karşılaşılan nonspesifik amplifikasyon ürünleri ile ilgili problemler aşılmıştır.

LCR son yıllarda gen mutasyonları (özellikle tek baz mutasyonlarının) ve cinsel temasla bulaşan etkenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Chlamydia, gonorrhoeae, listeria ve HPV'lannın tanısında PCR ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalarda oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. DNA kontaminasyonuna bağlı yalancı pozitif reaksiyonlar ve ortamdaki inhibitörlerden kaynaklanan yalancı negatif sonuçlar ise henüz çözümlenememiş problemler arasında yer almaktadır.

Cobas Amplicor (Roche Diagnostik Systems)

PCR temelinde çalışan bir sistemdir. Test ortamında hedef molekül ile aynı tüpte ve aynı koşullarda bir internal (iç) kontrol içerir. Amplifikasyon işlemi sırasında hedef molekül ile birlikte, internal kontrolde çoğalır. Bu sayede PCR işlemi sırasında örneğin bulunduğu her tüpte yalancı negatifliğe yol açabilecek inhibitör maddelerin varlığı kontrol edilebilmektedir. Çoğaltma sonrası, ürünler aynı problemlerle kaplı mikrodilüsyon plaklarında sulandırılmalarla hibridize edilir. Sonuçlar RNA veya DNA kopyası / ml olarak verilir.

SİNYAL AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Nükleik asit amplifikasyonu işlemi sırasında, reaksiyon ortamında bulunan ve yalnızca çift iplikli DNA 'ya bağlandığı zaman floresan renk veren boyalar (Cyber Green) aracılığı ile amplifikasyona bağlı DNA artışının ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Bu amaçla floresans okuyabilen thermocycler cihazları kullanılmaktadır. Bu cihazlar sayesinde tepkime sonrasında nükleik asit artışı

Tablo 4. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde karşılaşılan bazı problemler

PROBLEM	NEDEN
Yalancı Pozitif	Amlifiye olmuş ürün ile kontaminasyon Kontamine test malzemeleri Pozitif kontrol veya örnekler ile kontaminasyon Ortam koşullarının uygun olmaması
Yalancı Negatif	İnhibitörler Test sırasında yapılan miktar hataları Nükleik asitlerin yetersiz ekstraksiyonu Ekipman yetersizliği (Thermocycler) Reagent problemleri (Magnezyum konsantrasyonu, primer sentezi) Örnek yetersizliği
Aşırı Duyarlı	Aseptomatik yayılım, ölü mikroorganizmaların tanımlanması

izlemek mümkündür. Klasik PCR amplifikasyon temeline dayan bu yöntemde, amplifikasyon işleminin başlangıç aşamasında floresans renk veren boya ve denatüre edilmiş DNA parçaları aynı aynı bulunur. Bu nedenle floresans yok denecek kadar azdır. Primerlerin hedef moleküle bağlanmasını takiben floresan boya oluşan çift sarmal yapıya katılır ve ortama floresans verir. Primerlerin uzaması sırasında boya gittikçe artan miktarlarda DNA yapısına entegre olur. Floresans derecesindeki artışa bağlı olarak daha amplifikasyon işlemi sırasında elektroforeze gerek kalmadan sonuçlar değerlendirilebilir. Ayrıca bu testle; örneklerle eş zamanlı olarak nükleik asit miktarı bilinen standart örnekler çoğaltılıp, tüplerdeki hızlı artış zamanlarının karşılaştırılması ile hedef nükleik asit miktarı belirlenebilmektedir.

Yöntemin diğer bir avantajı, mutasyonlar sonucu oluşan antibakteriyel direncin saptanabilmesidir. Bu sistemde, mutasyonların arandığı bölgeye yan yana bağlanan uçlarında bulunan floresan boyalar arasındaki gerçekleşen enerji transferi ile floresans oluşumu sağlanır. Mutasyon belirleyecek olan probu, ortamın ısıtılması sonucu bağlı olduğu yerden ayrılarak floresansın düşüşüne neden olur. Bu şekilde erime sıcaklığı tepesi belirlenir. Bir mutasyon varlığında prob ile bağlandığı yer arasında uyumsuzluk görülür ve erime sıcaklığı tepesinde düşmeye neden olur.

Branched DNA Assay (b DNA)

Branched DNA yöntemi diğer DNA amplifikasyon tekniklerinden belirgin bir şekilde farklıdır. Burada

çoğalan nükleik asitler değil onlara bağlanan işaretlerdir. Uygulanışı ELISA testine çok benzer. Çeşitli problemler (yakalama, hedefe ve işarete bağlı problemler) hedef moleküle ve birbirlerine bağlanması sayesinde tüm hibridizasyon aşamalarından sonra her hedef moleküle 855 adet prob bağlanmış olur. Lüminesan substratla elde edilen işaretin ölçümü hedef molekül sayısı ile orantılıdır. Sonuçlar genome equivalents / ml (Eq / ml) olarak verilir. Bu teknik hedef çoğaltma yöntemlerine göre biraz daha az duyarlıdır. Ancak kontaminasyon riski bu yöntemde daha azdır. b DNA yöntemi özellikle HCV, HIV-1, HBV ve CMV tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri hızlı ve güvenilir testler olup, duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir. Tanı için az miktarda klinik materyal gerektirmeleri ve klinik materyallerde bulunan inhibitör maddelerden etkilenmemeleri nedeniyle izolasyonları, üretilmeleri veya identifikasyonları çok zor olan bakteriyel ve viral ajanların belirlenmesinde büyük yararlar sağlamaktadırlar. Ayrıca bu teknikler genellikle otomatize veya yarı otomatize sistemler halinde oldukları için personel hataları ve laboratuvar enfeksiyonları minimal düzeye indirilmiştir.

Ancak pahalı olmaları, deneyimli ve bilgili personel gerektirmeleri nedeni ile bugün sadece gelişmiş laboratuvarlarda kullanılmak alanı bulmuştur. Deneyimli personel, aseptik veya steril laboratuvarlarda koşulları sağlanmadığı sürece testlerden yeterli verim alınması oldukça zordur.

Testlerin işleyişi sırasında karşılaşılan bazı problemler Tablo 4' te gösterilmiştir.

Sonuç olarak; enfeksiyon hastalıklarının tanısında amplifikasyon yöntemleri; tanıyı destekleyici, duyarlılığı - özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren ve

güvenilir testlerdir. Ancak bu testlerin bir bölümü henüz standardizasyon aşamasında olup, kesin tanıda altın standart olarak kullanılan kültür yöntemlerinin yerini alamamıştır. Yeni geliştirilen ve geliştirilecek olan her yeni tekniğin mutlaka kontrollü olarak uygulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annu Rev Microbiol.* 1996; 50: 349-73.
2. Kocagöz T. Polimeraz zincirleme tepkimesi. *Medical Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi* 1996;1:112-8.
3. Arda M. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. " *Biyoteknoloji* ", 115-120, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:1, 1990.
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction in " *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* ", 2 nd ed., 14.2-14.35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
5. Saiki RK. Amplification of Genomic DNA in " *PCR Protocols* "(Innis MA., Gelfand DH, Ininsky JJ, White TJ, ed.) 13-20, Academic Press, Inc, San Diego, USA, 1990.
6. Glick RB, Pasternac JJ. Fundamentals of Molecular Biotechnology in " *Molecular Biotechnology* ", 71-76, American Soc Microb, Washington D.C, USA, 1994.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Enzymes Used in Molecular Cloning in " *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* ", 2 nd ed., 5.2-5.95, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
8. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid -based detection methods. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 370-86.
9. Tomkins LS. The use of molecular methods in infectious diseases. *N Engl J Med* 1992; 327: 1290- 7.
10. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252 : 1643-51.
11. Newton CR, Graham A. PCR. 2 nd ed., 1-8, Springer -Verlag New York Inc, (1997).
12. Engleberg CN. *Molecular Methods: Application for Clinical Infectious Diseases* 1994; 24: 490- 502.