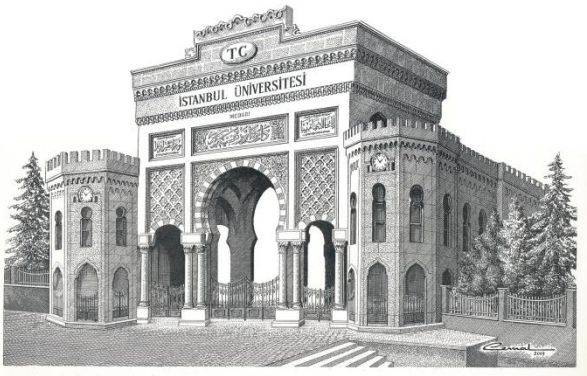




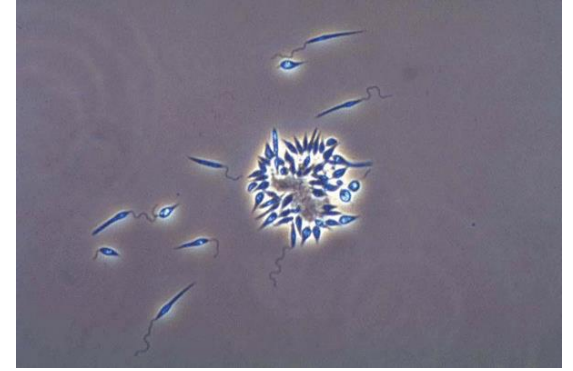
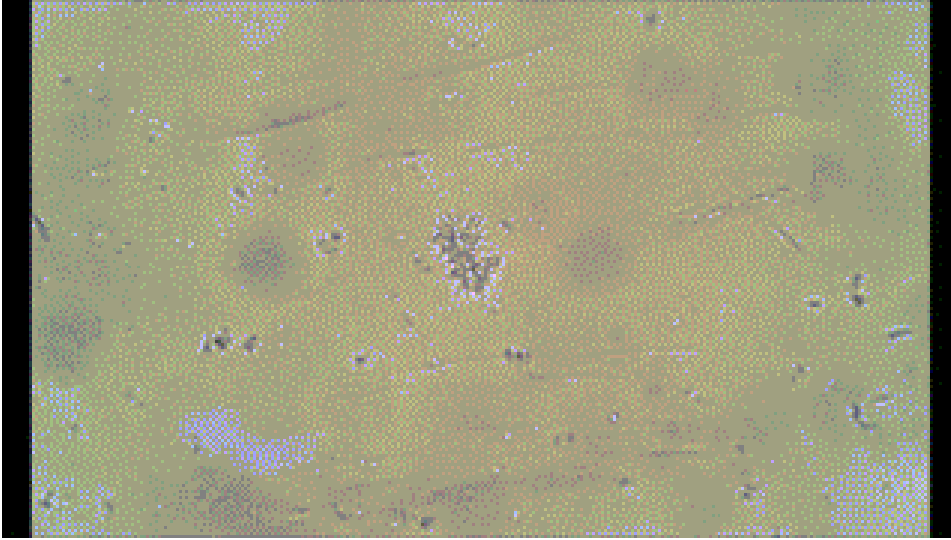
# LEISHMANIA İNFEKSİYONLARININ TANISINDA kDNA'YI SAPTAMAYA YÖNELİK REAL-TIME PCR TABANLI BİR SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ



Doğantürk YE, Kuskucu M.



# Amaç-1



*Leishmania*'nın hassas bir şekilde kantitasyonu





# XXXVI. TÜRK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

## BİLİMSEL PROGRAM

12 Kasım 2014, Çarşamba

Açılış Programı

Salon A

**17:00** Açılış Töreni  
TMC, KLİMUD, ESCMID, WFCC, Avustralya Mikrobiyoloji Dernek başkanları ve FEMS temsilcisinin konuşması

**18:00 - 19:00** Açılış Oturumu  
Oturum Başkanları: Nezahat GÜRLER, Faruk AYDIN

Ezber Bozan Leyşmanyaz Bulgularımız  
Ahmet ÖZBİLGİN

**19:00** Açılış Kokteyli



## Bir Kara Bulut: Şark Çıbanı

Amet Himi Hacıoğlu

Semret Göler

10.8.2014



### En Çok Okunanlar

Güçlü Dev

29 Eylül 2014 Pazartesi

Mars İstilası Başladı

1 Ekim 2014 Çarşamba

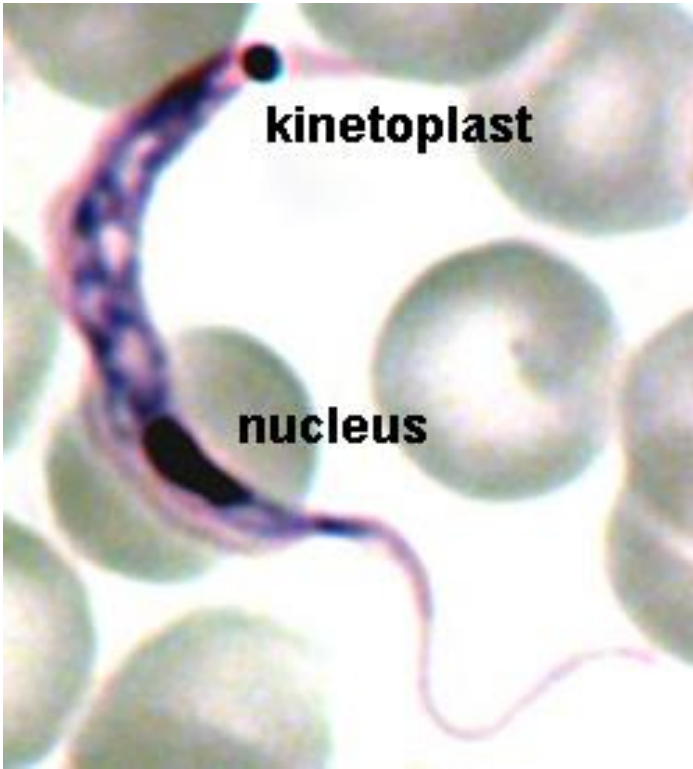
40 Yılda Yaban Hayatının

Yarısını Yok Eттіk

2 Ekim 2014 Perşembe

### E-Bülten

## *Gereç & Yöntem – 1. Hedef Seçimi*



Genomik DNA vs kDNA

# Gereç & Yöntem – 2. Primerlerin Tasarımı

Aile *Trypanosomatidae*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide#

gi|11990506|gb|AF167714.1|AF16 ACCTATGATGATCTTGGGTTGCCCTTAGGTTGGTGA---CTCTCTTTAATATTAAATAATTAATTAAGGTAAGTGCTTGGGCATGTGTTATAGCCATAGCGCTTTAGAATAGTTCG-ACTCCGAAGAT--TAGGTT-TGAGGTAGTAGCAAGCATGCAT  
gi|11493599|gb|AF169140.1|AF16 ..G..G..G.....A.....T.....G.....A..A.A.....C-CC..C.....GTT..TG.A...  
gi|4761808|gb|AF103741.1|AF103 ..G..G..G.....A.....T.....G.....A..A.A.....C-CCA..C.....GTT..T..A...  
gi|11990510|gb|AF168358.1|AF16 ..G..G..G.....T.....G.....A..A.A.....C-CCA..C.....G..GTT..T..A...  
gi|7339547|emb|AJ275327.1|Lei TTTGGG.C...GG...T...GGG..TA..AT.A.CACTT..C...GC.T.A.T...T---TT...C.T..A.C...AC...G.T...GATC..A..T.AC...A.G...ATAGG.G.AG...A..A.GACTTT.GTGT.CTG.  
gi|4761805|gb|AF103738.1|AF103 ..G..G..G.....A.....T.....G.....A..A.A.....C-CCA..C.....GTT..T..A...

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640

gi|11990506|gb|AF167714.1|AF16 TAAATCTAGTATATAATTTAGTCTATAATAACTGACATTACTCGTACACTATAAGTATTATGTTTAAATATATGTGCTATAAATTTGTATCTCGGGCTGTGAGTA-ATAGTAATATCTGTACCAATATATT---TATAGGTTGACACATACTGCAGTGAATT  
gi|11493599|gb|AF169140.1|AF16 .....CA.....G..G.A...T..T.T.....T..G.....A..G.....G.G.....G.G.  
gi|4761808|gb|AF103741.1|AF103 .....CA.....G..G.A...T..T.T.....T..G.....A..G.....G.G.....G.G.  
gi|11990510|gb|AF168358.1|AF16 .....CA.....G..G.A...T..T.T.....T..G.....A..G.....G.G.....G.G.  
gi|7339547|emb|AJ275327.1|Lei ---TG..A..C...GT..C.TCG.A.A.T.G...TA..A.T.G.C...A..A..G..C.C.TATT.TG...T.G.T.AT.TTA.A.TGC..T..TT..CG..A..T.GT.G...GGG.G..TA..CCTACC...T..C...  
gi|4761805|gb|AF103738.1|AF103 .....CA.....G.....G..G.A...T..T.T.....T..G.....A..G.....G.G.....G.G.

650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

gi|11990506|gb|AF167714.1|AF16 GAAATTTAA---TAAATTGGAGTTGGGCT-TGGAAATCTGCTTAAATCC-TA-AAAATGGTGGAAATGGCCAAAAATGCGCAATTTTTCGAACCTTTTCTGGTCTCCGGGTAGGGGCGTTCTGCGAAAAACGAAAAATGGGTGCAGAAATCCCGTT  
gi|11493599|gb|AF169140.1|AF16 .....G.....G..C..G..G..GGT..G..T..GG..A..A.G.....TG.GG.G.AA.....A..T.G...  
gi|4761808|gb|AF103741.1|AF103 .....G.....G..C..G..G..GGT..G..T..GG..A..A.G.....TG.GG.G.AA.....A..T.G...  
gi|11990510|gb|AF168358.1|AF16 .....G.....G..C..G..G..GGT..G..T..CGG..A..A.G.....TG.GG..AA.....AG..T.G...  
gi|7339547|emb|AJ275327.1|Lei ---TT.CC.GAGGG.GGG..AC.GGAATTGG..GG.G.T..T.GG..T.G.CG..A.CT.AA..CC.T..TA..A..C.....A..T.G...  
gi|4761805|gb|AF103738.1|AF103 .....G.....G..CA...G..GG.GGT..G..T..GG..A..A.G.....TG.GG.G.AA.....A..T.G...

810 820 830 840

gi|11990506|gb|AF167714.1|AF16 CAAAAATCGGCCAAAAATGCCAAAAATCGGGTCCGGGGGGGGAACTG  
gi|11493599|gb|AF169140.1|AF16 .....A.....C.....  
gi|4761808|gb|AF103741.1|AF103 .....A.....C.....  
gi|11990510|gb|AF168358.1|AF16 .....C.....C.....  
gi|7339547|emb|AJ275327.1|Lei .....AG.....TTTT.A..C.....  
gi|4761805|gb|AF103738.1|AF103 .....C.....C.....

compartments Mitochondrion (66) Accession: AB901670.1 GI: 510501299

Sequence length Custom range...  [GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Release date

3. 599 bp linear DNA

Accession: U19810.1 GI: 643465

[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Leishmania amazonensis kinetoplast minicircle, partial sequence, fragment LAMAZ](#)

Primer F (5'-CAG TTT CCC GCC YCG GAG CYS A-3')

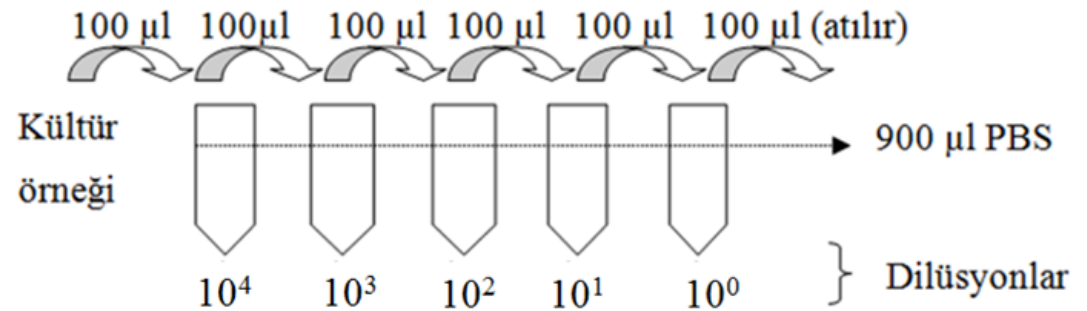
Primer R (5'-CTC CGG GTA GGG GCG TTC TGC-3')

# Gereç & Yöntem – 3. Standart Örneklerin Hazırlanması

- T.C. Sağlık Bakanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'ndan **NNN** besiyeri içinde temin edilen *L. tropica* suşu sıvı hücre kültürü besiyerinde (AmnioMAX™-II Complete Medium) üretim yapıldı.
- Hücreler sayıldı
- 5 dilüsyon ( $10^4 - 10^0$ ) hazırlandı



Şekil 3-2: Fast-Read 102 Sayım Lamı



Şekil 3-1: Dilüsyonların hazırlanması

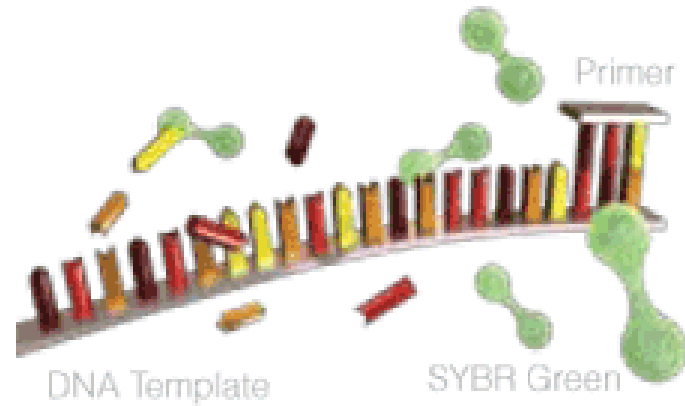
## *Gereç & Yöntem – 4. Nükleik Asit Eldesi*

- Nükleik asit eldesi için Chelex yöntemi kullanıldı.
- Kaynat → Santrüfüt et → Süpernatantı kullan



# Gereç & Yöntem – 4. Real-Time PCR Set-Up

DNaz RNaz free su	4 µl
2x PCR Miks (SYBR Greenli)	10 µl
Primer F (5'-CAG TTT CCC GCC YCG GAG CYS A-3') (25 mM)	0,5 µl
Primer R (5'-CTC CGG GTA GGG GCG TTC TGC-3') (25 mM)	0,5 µl
Hedef	5 µl



Isı – Süre	Döngü	İşlev
95°C / 2 dakika	1	İlk Denatürasyon
95°C / 15 saniye 56°C / 60 saniye 72°C / 10 saniye	45	PCR
95°C / 60 saniye 70°C / 60 saniye 95°C / 10 saniye	1	Erime Eğrisi Analizi Isı Profili
37°C / 10 saniye	1	Soğutma



# *Gereç & Yöntem – 5. Performans Değerlendirmesi*

Eur J Hum Genet. 2010 Dec; 18(12): 1276–1288.

PMCID: PMC3002854

Published online 2010 Jul 28. doi: [10.1038/ejhg.2010.101](https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.101)

## **A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests**

[Christopher J Mattocks](#)<sup>1,7,\*</sup>, [Michael A Morris](#)<sup>2,7</sup>, [Gert Matthijs](#)<sup>3,7</sup>, [Elfriede Swinnen](#)<sup>3</sup>, [Anniek Corveleyn](#)<sup>3</sup>, [Els Dequeker](#)<sup>3</sup>, [Clemens R Müller](#)<sup>4</sup>, [Victoria Pratt](#)<sup>5</sup> and [Andrew Wallace](#)<sup>6</sup>, for the EuroGentest Validation Group<sup>8</sup>

Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3): 550–576.

PMCID: PMC2901657

doi: [10.1128/CMR.00074-09](https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09)

## **Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases**

[Eileen M. Burd](#)<sup>\*</sup>

[Author information](#) ► [Copyright and License information](#) ►

# Gereç & Yöntem – 5. Performans Değerlendirmesi

- Laboratuvarda kullanılacak test performansının bilinmesi ve buna göre test sonuçları raporlanabilir bu bağlamda asgari;
- Testin kendi laboratuvar şartlarındaki doğruluğunu (accuracy) belirlenmesi,
  - Sonucu belirlenen en az 20 örneğin veya referans materyalin yüksek ve düşük konsantrasyonlu 2 serisinin duplike şekilde 2-5 kez aynı sonucu vermesi gerekmektedir.
- Tekrarlanabilirliğinin (precision) belirlenmesi,
- Kalitatif testler için alt saptama sınırı, kantitatif testler için ise dinamik aralığını saptanması gerekmektedir
  - *Kantitatif testler için ise dinamik saptama aralığı, yani kantitasyon yapılabilen kopya, ünite, v.b. sınırları belirlenerek, saptama sınırına yakın konsantrasyonlardan başlamak üzere 5-7 konsantrasyon duplike olarak test edilir.*

# *Gereç & Yöntem – 5. Performans Değerlendirmesi*

**Bu bilgiler doğrultusunda...**

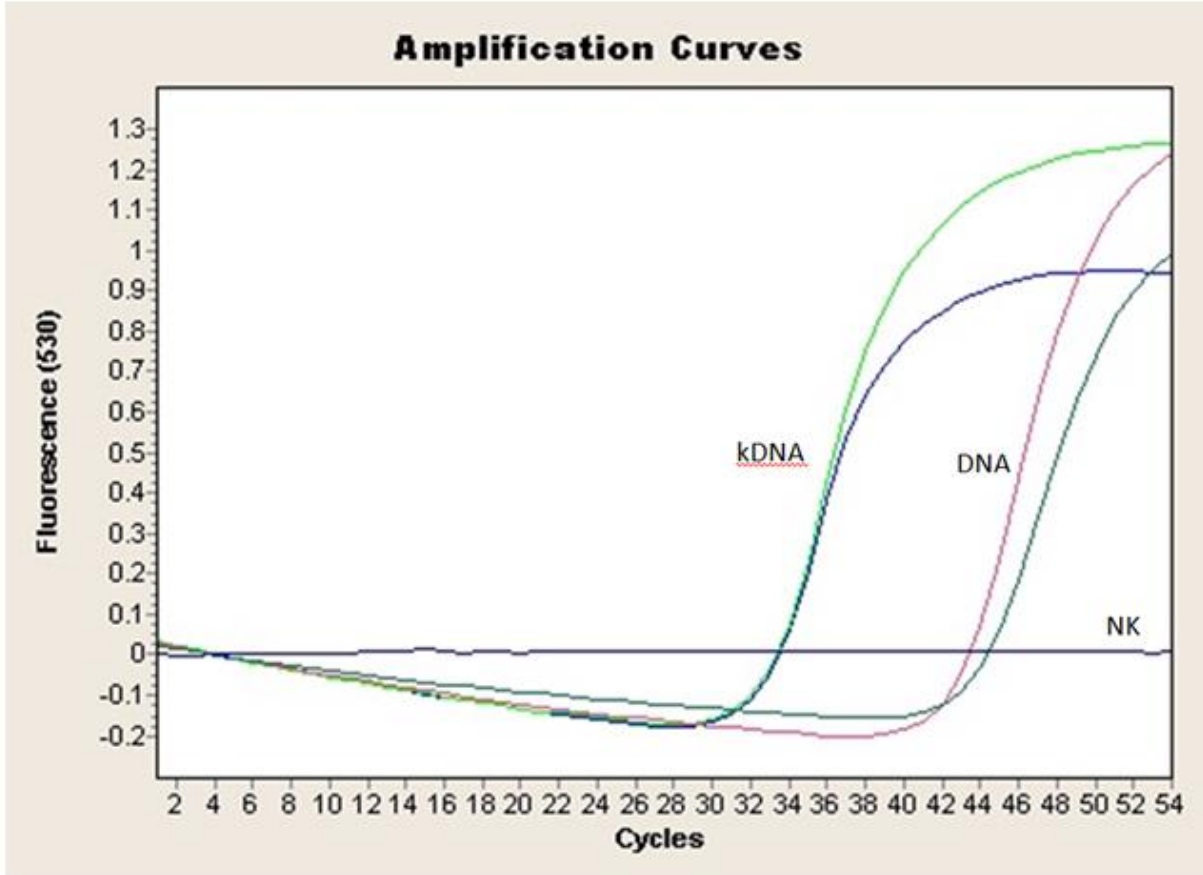
✓ 5 dilüsyon ( $10^4 - 10^0$ )

✓ Her bir dilüsyon 3 tekrarlı

✓ 3 farklı günde

Çalışıldı.

# Bulgular & Tartışma; Genomik DNA vs kDNA



Genomik DNA CT: 40,38  
Kinetoplast DNA CT: 31,56

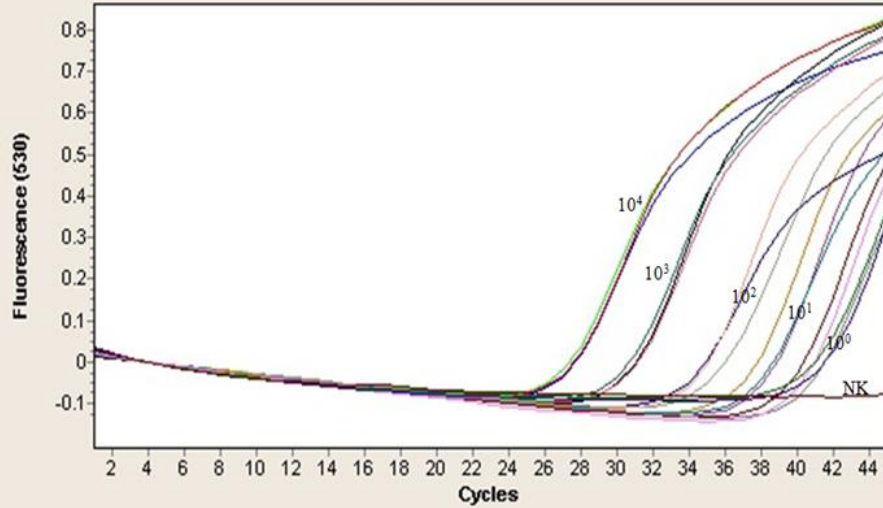
dCT: 8,82, 2<sup>d</sup>CT: 451,94

Şekil 4-1: *Leishmania* genomik DNA ile kinetoplast DNA'nın karşılaştırılması

# Bulgular & Tartışma 1. Gün

Tablo 4-2: Birinci periyottaki çalışmaya ait sonuçlar, CT değerleri, ortalamaları, standart değer (STD) ve varyasyon katsayısı (coefficient of variation) (CV) verileri

Amplification Curves

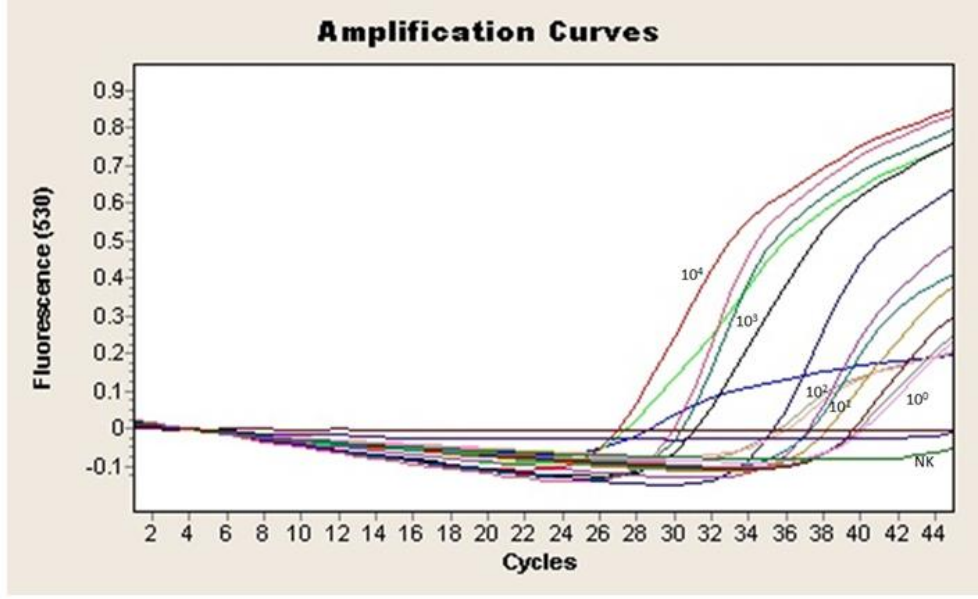


Şekil 4-2: Dilüsyonu yapılmış *Leishmania* solüsyonlarının, real-time PCR ile yapılmış birinci periyot çalışma sonuçları

Çalışma	<i>Leishmania_02092015_01</i>				
No	Örnek	CT	Ortalama	STD	CV
1	LT1	25,84	25,85	0,11	0,996
2	LT1	25,72			
3	LT1	25,99			
4	LT2	29,33	29,22	0,16	0,995
5	LT2	29,33			
6	LT2	28,99			
7	LT3	32,57	33,31	0,74	0,978
8	LT3	34,32			
9	LT3	33,05			
10	LT4	36,69	36,22	0,41	0,989
11	LT4	35,69			
12	LT4	36,28			
13	LT5	39,54	38,85	0,53	0,986
14	LT5	38,75			
15	LT5	38,25			
16	NK	>40,00			
17	NK	>40,00			
18	NK	>40,00			

# Bulgular & Tartışma 2. Gün

Tablo 4-3: İkinci periyottaki çalışmaya ait sonuçlar, CT değerleri, ortalamaları, STD ve CV verileri

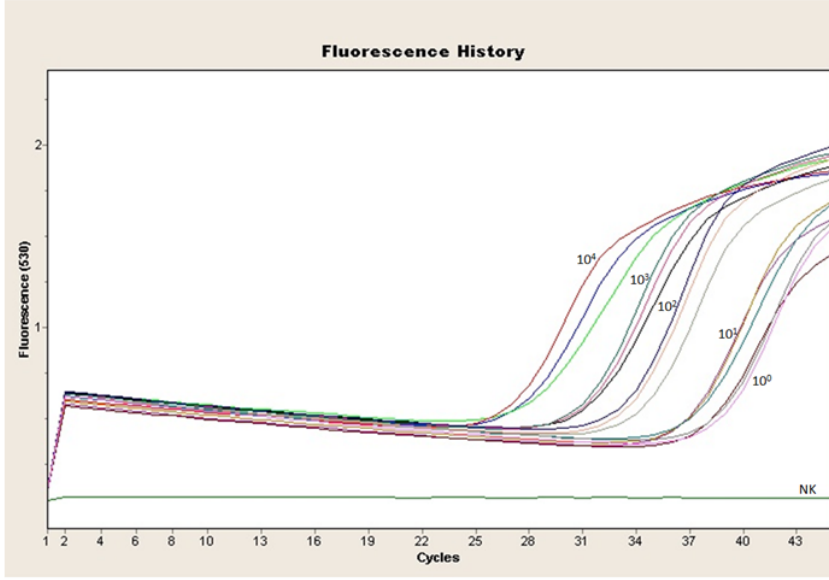


Şekil 4-4: Dilüsyonu yapılmış *Leishmania* solüsyonlarının, real-time PCR ile yapılmış ikinci periyot çalışma sonuçları

Çalışma No	<i>Leishmania_08092015_01</i>				
	Örnek	CT	Ortalama	STD	CV
1	LT1	24,87	24,94	0,10	0,996
2	LT1	24,88			
3	LT1	25,08			
4	LT2	28,90	28,28	0,47	0,983
5	LT2	27,77			
6	LT2	28,18			
7	LT3	32,94	32,60	0,39	0,988
8	LT3	32,06			
9	LT3	32,80			
10	LT4	34,59	35,00	0,41	0,988
11	LT4	35,56			
12	LT4	34,84			
13	LT5	36,87	37,13	0,30	0,992
14	LT5	36,97			
15	LT5	37,54			
16	NK	>40,00			
17	NK	>40,00			
18	NK	>40,00			

# Bulgular & Tartışma 3. Gün

Tablo 4-4: Üçüncü periyottaki çalışmaya ait sonuçlar, CT değerleri, ortalamaları, STD ve CV verileri



Şekil 4-6: Dilüsyonu yapılmış *Leishmania* solüsyonlarının, real-time PCR ile yapılmış üçüncü periyot çalışma sonuçları

Çalışma No	Leishmania_10092015_01 Örnek	CT	Ortalama	STD	CV
1	LT1	26,45	26,43	0,65	0,975
2	LT1	27,22			
3	LT1	25,62			
4	LT2	30,26	30,01	0,21	0,993
5	LT2	30,02			
6	LT2	29,74			
7	LT3	32,14	32,46	0,37	0,989
8	LT3	32,98			
9	LT3	32,27			
10	LT4	35,27	35,64	0,30	0,992
11	LT4	35,65			
12	LT4	36,00			
13	LT5	36,27	36,92	0,46	0,987
14	LT5	37,18			
15	LT5	37,31			
16	NK	>40,00			
17	NK	>40,00			
18	NK	>40,00			

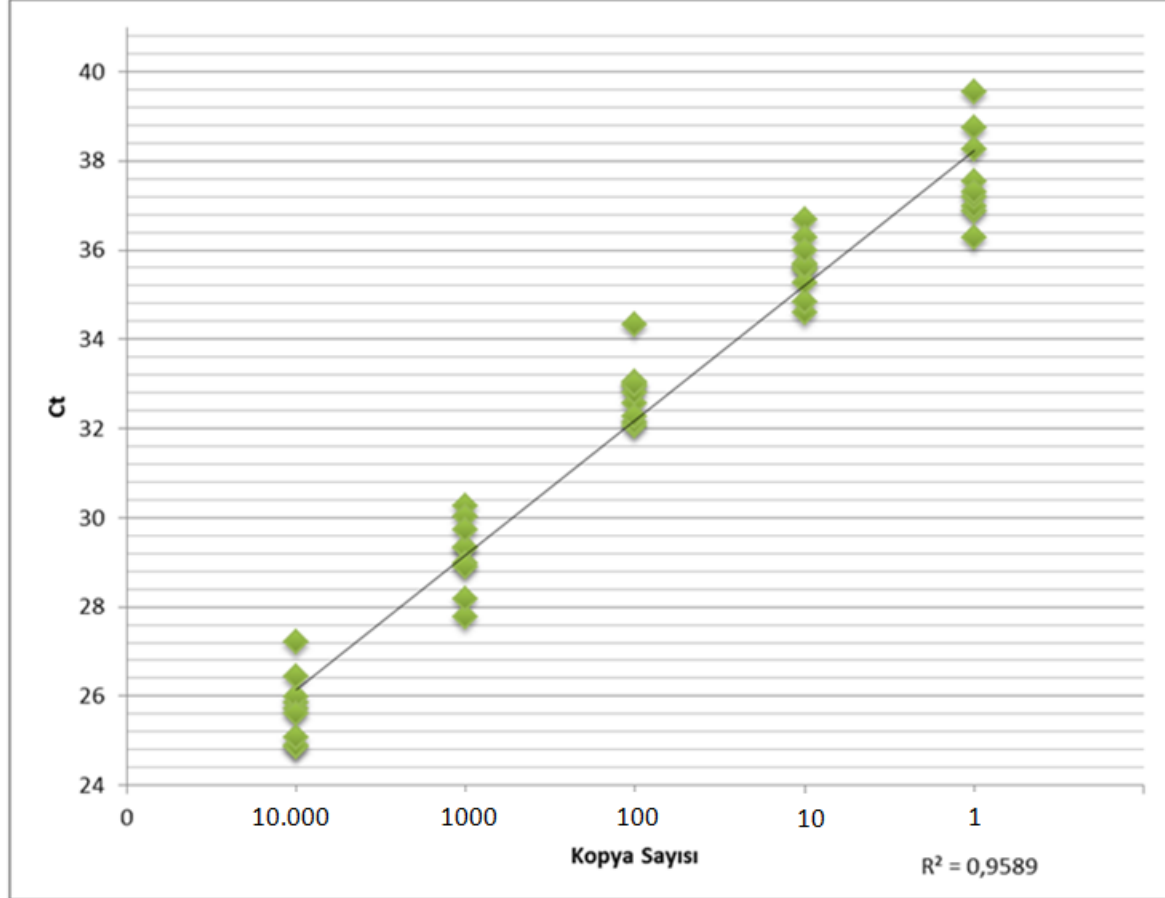
# Bulgular & Tartışma Toplu Sonular

Tablo 4-5: Farklı tarihlere ait çalışma verilerinin karşılaştırılması, CT değerleri ortalamaları, STD ve CV verileri

Çalışma	rnek	Ct	Ortalama	STD	CV
<i>Leishmania</i> _02092015_01 (1. gün)	LT1	25,85	25,74	0,61	0,98
<i>Leishmania</i> _08092015_01 (2. gün)		24,94			
<i>Leishmania</i> _10092015_01 (3. gün)		26,43			
<i>Leishmania</i> _02092015_01 (1. gün)	LT2	29,22	29,17	0,70	0,98
<i>Leishmania</i> _08092015_01 (2. gün)		28,28			
<i>Leishmania</i> _10092015_01 (3. gn)		30,01			
<i>Leishmania</i> _02092015_01 (1. gn)	LT3	33,31	32,79	0,37	0,99
<i>Leishmania</i> _08092015_01 (2. gn)		32,60			
<i>Leishmania</i> _10092015_01 (3. gn)		32,46			
<i>Leishmania</i> _02092015_01 (1. gn)	LT4	36,22	35,62	0,50	0,99
<i>Leishmania</i> _08092015_01 (2. gn)		35,00			
<i>Leishmania</i> _10092015_01 (3. gn)		35,64			
<i>Leishmania</i> _02092015_01 (1. gün)	LT5	38,85	37,63	0,86	0,98
<i>Leishmania</i> _08092015_01 (2. gün)		37,13			
<i>Leishmania</i> _10092015_01 (3. gün)		36,92			



# Bulgular & Tartışma



Şekil 4-8: Farklı tarihlere ait çalışma verilerinin karşılaştırılması, Cycle of Threshold (CT) değerleri ve uyum ( $R^2 = 0,9589$ )

Teşekkür ederim...



Yağmur Eylül Doğanürk