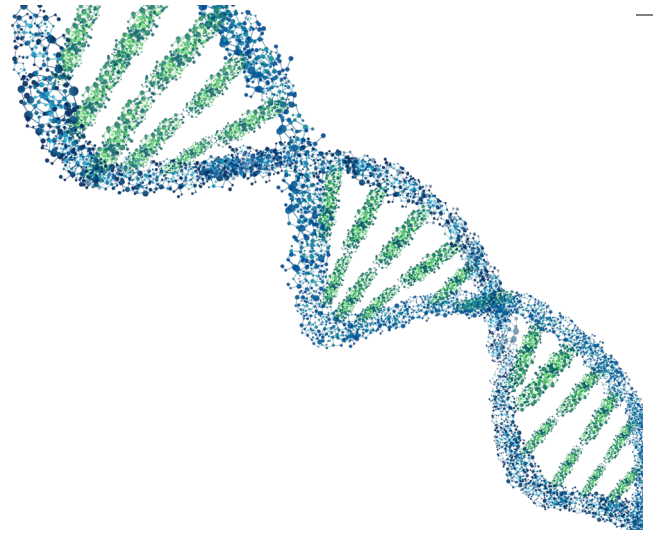


BÖLÜM 24

RİBOTİPLENDİRME



Meryem GÜVENİR¹

Giriş

1986'da taksonomik araç olarak ribonükleik asit gen kısıtlama modellerinin tanıtılmasından bu yana, ribotiplendirme yöntemi sistematik, epidemiyolojik, ekolojik mikroorganizma çalışmalarında kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Ribotiplendirme adının yanlış bir adlandırma olduğu ve bu durumun gözlenen polimorfizmlerin doğrudan ribozomal RNA gen dizilerinden kaynaklandığına dair bir yanlış anlaşılma olduğu fark edilmiştir. Son 25 yılda, ribotiplendirme yönteminde yapılan modifikasyonlar sonucunda, yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri bildirim süreci iyileştirilmiştir. Ayrıca, gıda üretimi, ilaç endüstrisi ve kültür koleksiyonlarının kalite kontrolünde ribotiplendirme otomasyon sistemleri kullanılmaya başlanmış ve verimli sonuçlar elde edilmiştir ¹.

Bakteri Ribozomu

Ribozom, proteinler ve RNA'dan oluşan bir ribonükleoprotein kompleksidir. Ribozomlar, hücrede mRNA'yı bilgi kaynağı olarak kullanarak protein

sentezinin (translasyon) gerçekleştiği organeldir. Bakterilerde, ribozomlar büyük alt birim (50S) ve küçük alt birim (30S) olmak üzere iki alt birimden oluşurlar. mRNA etrafında toplanmış iki alt birimden oluşan fonksiyonel ribozomun moleküler ağırlığı 2.5 megadalton ve sedimentasyon katsayısı 70S'dir. Küçük alt birim (30S); 16S ribozomal RNA'dan ve 20 proteinden oluşur. mRNA'nın okunmasına izin veren bölümdür. Büyük alt birim ise; 23S ribozomal RNA, 5S ribozomal RNA ve 30 proteinden oluşur. Küçük alt birim tarafından okunan mRNA'ya karşılık gelen proteinlerin sentezlenmesine izin veren bölgedir ².

Ribozomal rRNA

Tipik olarak, her ribozomal operon, bir polisistronik operon olarak kopyalanan 16S, 23S ve 5S yapısal ribozomal RNA (rRNA) moleküllerini kodlayan üç genden oluşur. Bakteri türleri arasında, yapısal rRNA genlerinin ortalama uzunlukları 16S için 1.522 baz çifti [base pair (bp)]; 23S rRNA için 2.971 bp ve 5S için 120 bp'dir ². Bu üç rRNA geninin kopya sayıları, genel ribozomal operon boyutları, nükle-

¹ Prof. Dr., Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., Güzelyurt, KKTC, meryem.guvenir@neu.edu.tr

len geniş bir patojen yelpazesinin bulunması nedeniyle kısıtlı kalmaktadır. Multipleks gerçek zamanlı PCR rutin kullanımda patojenlerin hızlı tanınmasını kolaylaştırmakla birlikte, örnekte hedeflenen patojenler dışında mikroorganizmaların bulunması halinde yöntemin duyarlılığı sınırlanmaktadır ²⁵.

16S rRNA, bakterilerin tanımlanmasında oldukça kabul görmüş bir yöntemdir. Bu yöntem izolatların tanımlanmasında kullanılabilirdiği gibi kültürü yapılamayan bakteriyel patojenlerin de saptanmasını sağlamaktadır ²⁶. Ancak PCR bazlı bu yöntemin en önemli dezavantajı bazı klinik örneklerde polimerazı inhibe eden molekül ve bileşenlerin olması nedeniyle negatif ve kontaminant mikroorganizmalardan DNA'nın amplifikasyonuna bağlı yanlış pozitif sonuç vermesidir ²⁷.

Ribotiplendirme, tüketim ürünleri ve diğer bütün kaynaklardan izole edilen bakteriler arasındaki ilişkilerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Kontamine olmuş yiyeceklerdeki patojenin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, ribotiplendirme yöntemi ile zoonozlara neden olan enfeksiyon etkeninin belirlenmesi ve yayılması da araştırılabilmekte, böylece enfeksiyonun bulaşma yolu tanımlanabilmektedir. Bu nedenle, ribotiplendirme moleküler epidemiyoloji açısından çok önemli bir yöntemdir ¹¹.

Kaynaklar

- Schumann P, Pukull R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 2013;36: 369-375.
- Renvoise A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: Past, present or future of bacteriology. *Medicine et maladies infectieuses* 2013;43: 322-330.
- RR Gutell, presented at The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells, Shimoda, Japan, 1992.
- Kolbert CP, DH Persing. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 1999;2: 299-305.
- Pace NR, GJ Olsen, CR Woese. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 1986;45: 325-326.
- Clarridge III JE. Impact of 16S Rna gene sequene analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17: 840-62.
- Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification sequencing. *Clin Infect Dis* 2007;44: 1108-14.
- Sönmez M. Anne Sütünde İzole Edilen Laktik Asit bakterilerinin 16s rRNA Dizi Analizi ve Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2018.
- Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watanabe H. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an Improved Polymerase Chain Reaction Model. *J Clin Microbiol* 1992;30(9): 2484-2486.
- Reesink HW, Mohammadi T, Pietersz RN, Savelkoul PH. Rapid screening by real-time 16S rDNA PCR for bacterial contamination of blood products. *Clin Chem Lab Med* 2008;46: 954-62.
- Sarkaya R. *Cryptosporidium* türlerinin tanımlanmasında yeni bir yaklaşım: Ribotiplendirme. Gazi Üniversitesi Eğitim Fak 2004;5(2): 13-26.
- Michaeli TM, John MM. *Brock biology of microorganisms*. Thirteenth Edition. Pearson Education. Inc. Publishing as Prentice Hall, 2012.
- Wang X, Jordan IK, Mayer LW. A phylogenetic perspective on molecular epidemiology. *Mol Med Microbiol* 2015;1: 517-36
- Schumann P, Pukull R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 2013;36: 369-375.
- Kostman JR, Alden MB, Mair M, et al. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J Infect Dis* 1995;17(1): 204-8.
- Villard L, Kodjo A, Borges E, et al. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosum* by 16-23S spacer amplification. *FEMS Microbiol Lett* 2000;185(1): 83-87.
- Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(2): 262-73.
- Satılmış Ş. Hastanemizdeki Steril Vücut Bölgeleri Enfeksiyonlarında 16S rRNA Analiz Yöntemlerinin Tanıdaki Yeri. Marmara Üniversitesi Tıp. Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi-2018.
- Grif K, Dierich MP, Much P, Hofer E, Allerberger F. Identifying and subtyping species of dangerous pathogens by automated ribotyping. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003;47: 313-320.
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganism-sin blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000;38: 830-8.
- Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridization (FISH)-the next generation. *FEMS Microbiol Lett* 2005;246: 151-8.
- Aman R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Rev Microbiol* 2008;6: 340-8.
- Qurban A, Ameen A. Bacterial Identification by 16S rRNA Ribotyping: A Review. *Biotechnol Ind J* 2020;16(2): 204.
- Sacchi CT, Alber D, Dull P, Mothershed EA, Whitney AM, Barnett GA, et al. High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping. *J Clin Microbiol* 2005;43: 3734-42.
- Sancho-Tello S, Bravo D, Borrás R, Costa E, Muñoz-Cobo B, Navarro D. Performance of the LightCycler SeptiFast test Mgrade in detecting microbial pathogens in purulent fluids. *J Clin Microbiol* 2011;49(8): 2988-91.
- Keller PM, Rampini SK, Bloemberg GV. Detection of a mixed infection in a culture-negative brain abscess by broad-spectrum bacterial 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 2010;48(6): 2250-2.
- Leo MM, Ghidini V, Tafi MC, Castellani F, Trento I, Boaretti M. Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. *FEMS Microbiol Lett* 2014;354(2): 153-60.