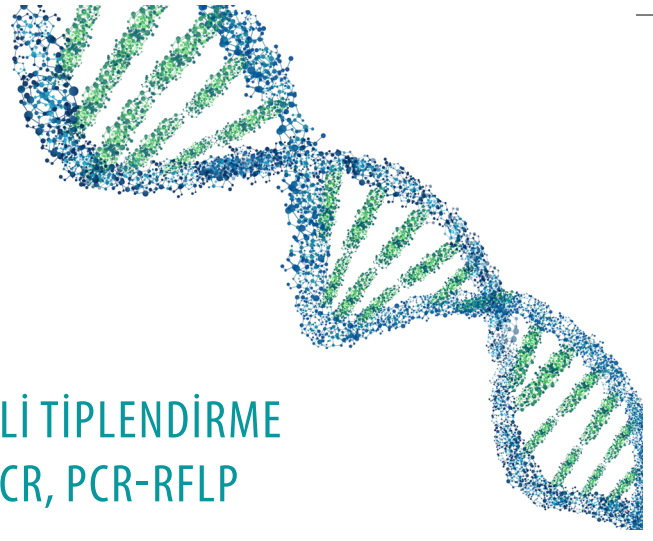


BÖLÜM 25

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEMELLİ TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ: AP-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, PCR-RFLP



Ayşegül KARAHASAN¹
Özgenur DEMİRKOL²

Son yıllarda, bakteri izolatlarının tiplendirilmesine yönelik teknik gelişmeler yakın gelecekte patojenik mikroorganizmaların tanımlanma ve ayırt edilme şeklini etkileyecek tamamen yeni teknolojilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Tiplendirme yöntemlerinin otomasyonuna, çözünürlüklerinin ve çıktılarının iyileştirilmesine ve yeterli biyoinformatik araçların tasarımına yönelik önemli ölçüde yol kat edilmiştir. Deoksiribonükleik asit (DNA) dizilerini ve DNA mikro dizi profillerini içeren sürekli artan sayıda genotiplendirme veri tabanı, artık daha kolay ve daha hızlı laboratuvarlar arası karşılaştırmalara, geriye dönük analizlere ve bakteriyel enfeksiyonların uzun vadeli epidemiyolojik gözetimine olanak tanımaktadır. Ne yazık ki, günümüzde tek bir ideal tiplendirme yöntemi mevcut değildir ve her genotiplendirme yaklaşımının çeşitli avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle, ortama bağlı olarak (yerel, ulusal veya uluslararası) bir veya daha fazla farklı tiplendirme yönteminin uygulanması gerekmektedir. Yerel bir hastalık salgınını kontrol altına almak için hızın önemli olduğu durumlarda yüksek ayırım gücüne sahip polime-

raz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] temelli bir yöntemle izolatların karakterize edilmesi tercih edilebilir. Bununla birlikte, farklı coğrafyaları da etkileyen bir salgın durumunda, farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların güvenilir bir şekilde karşılaştırılabilmesi için "pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) gibi daha sağlam bir tiplendirme yöntemine ihtiyaç duyulacaktır. Aynı türe ait farklı izolatları ayırt etmeye yönelik tiplendirme yöntemleri, enfeksiyon önleme ve kontrolünde temel epidemiyolojik araçlardır. Serotip, biyotip, faj tipi veya antibiyogram gibi fenotiplere dayalı geleneksel tiplendirme yöntemleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, izolatların moleküler düzeyde ilişkisini inceleyen daha yeni yöntemler, bakteri türleri ve alt türleri arasında ayırım yapma yeteneğimizde devrim yaratmış ve gelişmiş survekans ve salgın tespiti için yeni araçlar sağlamıştır. Yeni nesil dizileme teknolojisi küçük araştırma ve klinik laboratuvarlarda bile bakteriyel tam genom dizilemeyi olanaklı kılmıştır ve yakın gelecekte, yüksek ayırım gücü nedeniyle günümüzde kullanılan tiplendirme yöntemlerinin yerini al-

¹ Prof. Dr. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, aysegulkarahasan@gmail.com

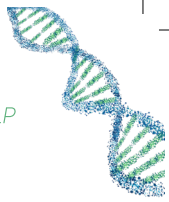
² Dr., Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ozgedemirkol1995@gmail.com

ve rep-PCR'nin yakın genetik ilişkili izolatların belirlenmesi için karşılaştırılabilir bir ayırım gücüne sahip olduğu saptanmıştır ⁴⁶. Portekiz'de sağlıklı ve hasta gökkuşağı alabalıklarının derilerinden, midelerinden veya su ürünleri yetiştiriciliği tesisinin sularından izole edilen 36 *Aeromonas* suşu rep-PCR ve ERIC-PCR ile tiplendirilmiş ve bu yöntemlerin yüksek ayırt edicilik ve tekrarlanabilirlikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği saptanmıştır ⁴⁷. 2003 yılında Belçika'da *Salmonella* ve *Shigella* Ulusal Referans Merkezi'nde 12.894 *Salmonella* izolatı ile yapılan çalışmada moleküler ayırım için beş rep-PCR tekniği [ERIC1R-ERIC2 ve REP1R-REP2I primer setleri ve ERIC2, BOXA1R ve (GTG) primerleri] karşılaştırılmış, tüm suşların, ERIC ve (GTG)5 primeri ile tiplendirilebildiği bildirilmiştir ⁴⁸. İngiltere'de Anaerob Referans Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilen 50 *Clostridium difficile* (PCR ribotip 001) izolatının genomik çeşitliliğini belirlemek için REP-PCR, BOX-PCR ve ERIC-PCR yöntemleri kullanılmış ve rep-PCR'nin en yüksek ayırt ediciliğe sahip olduğu gösterilmiştir ⁴⁹.

Sonuç olarak, her genotiplendirme yaklaşımının çeşitli avantajları ve dezavantajları olsa da uygulama süresinin kısalığı, pratikte uygulanabilir olması ve düşük maliyet ve yaygın olarak kullanılabilmesi gibi avantajları nedeniyle PCR temelli yöntemler önerilmektedir.

Kaynaklar

- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23(21): 4407-14.
- Duim B, Wassenaar TM, Rigter A, Wagenaar J. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(6): 2369-75.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013;18(4):20380.
- Babu KN, Rajesh MK, Samsudeen K, Minoo D, Suraby EJ, Anupama K, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. *Methods Mol Biol* 2014;1115: 191-209.
- Visca P, D'Arezzo S, Ramiés F, Gelfand Y, Benson G, Vergnaud G, et al. Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. *Microbiol* 2011;157(Pt 9): 2582-94.
- Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* 2009;9(10):611-6.
- Beall B, Facklam R, Thompson T. Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1996;34(4): 953-8.
- Carrico JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, Pinto FR, de Lencastre H, Almeida JS, et al. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2006;44(7): 2524-32.
- Bessen DE, McGregor KF, Whatmore AM. Relationships between emm and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiol* 2008;8: 59.
- Sabat AJ, Chlebowicz MA, Grundmann H, Arends JP, Kampinga G, Meessen NE, et al. Microfluidic-chip-based multiple-locus variable-number tandem-repeat fingerprinting with new primer sets for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2012;50(7): 2255.
- Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15(1):60-4.
- Luczak-Kadlubowska A, Sabat A, Tambic-Andrasevic A, Payerl-Pal M, Krzyszton-Russjan J, Hryniewicz W. Usefulness of multiple-locus VNTR fingerprinting in detection of clonality of community- and hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008;94(4): 543-53.
- Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(7): 3095-100.
- Overdevest IT, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Rijnsburger M, Savelkoul P, et al. Evaluation of the DiversiLab typing method in a multicenter study assessing horizontal spread of highly resistant gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 2011;49(10): 3551-4.
- Deurenberg RH, Nulens E, Valvatne H, Sebastian S, Driessen C, Craeghs J, et al. Cross-border dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin region. *Emerg Infect Dis* 2009;15(5): 727-34.
- Singh J, Kumar A, Yadav SK, Yadav R, Singh VK. Study of antibiotics sensitivity pattern and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from human and animal pyogenic cases. *Arch Microbiol* 2022;204(5): 245.
- Wendel AF, Peter D, Mattner F, Weiss M, Hoppenz M, Wolf S, et al. Surveillance of *Enterobacter cloacae* complex colonization and comparative analysis of different typing methods on a neonatal intensive care unit in Germany. *Antimicrob Resist Infect Control* 2022;11(1): 54.
- Yousefi Nojookambari N, Sadredinamin M, Dehbanipour R, Ghalavand Z, Eslami G, Vaezjalali M, et al. Prevalence of β -lactamase-encoding genes and molecular typing of *Acinetobacter baumannii* isolates carrying carbapenemase OXA-24 in children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2021;20(1): 75.
- Khosravi AD, Montazeri EA, Maki SR. Antibacterial effects of Octenisept, and benzalkonium chloride on *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples and determination of genetic diversity of isolates by RAPD-PCR method. *Mol Biol Rep* 2021;48(11): 7423-7431.



20. Chen J, Hu N, Xu H, Liu Q, Yu X, Zhang Y, et al. Molecular Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Virulence Evaluation of *Candida* Isolates Causing Invasive Infection in a Tertiary Care Teaching Hospital. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11: 721439.
21. Kuznetsova MV, Gizatullina JS. Epidemiological characteristics of uropathogenic isolates of *Escherichia coli* in hospitals. *Klin Lab Diagn* 2021;66(4): 248-256.
22. Milojković M, Nenadović Ž, Stanković S, Božić DD, Nedeljković NS, Čirković I, et al. Phenotypic and genetic properties of susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Southern Serbia. *Arh Hig Rada Toksikol* 2020;71(3): 231-250.
23. Schäfer E, Malecki M, Tellez-Castillo CJ, Pfenningwerth N, Marlinghaus L, Higgins PG, et al. Molecular surveillance of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8: 208.
24. Mamishi S, Mohammadian M, Pourakbari B, Hosseinpour Sadeghi R, Haghi Ashtiani MT, Abdosalehi MR, et al. Antibiotic Resistance And Genotyping Of Gram-Positive Bacteria Causing Hospital-Acquired Infection In Patients Referring To Children's Medical Center. *Infect Drug Resist* 2019;12: 3719-3726.
25. Lins RX, Hirata R Junior, Wilson M, O Lewis MA, Fidel RAS, Williams D. Comparison of genotypes, antimicrobial resistance and virulence profiles of oral and non oral *Enterococcus faecalis* from Brazil, Japan and the United Kingdom. *J Dent* 2019;84: 49-54.
26. Strateva T, Sirakov I, Stoeva T, Stratev A, Dimov S, Savov E, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014-2016). *J Glob Antimicrob Resist* 2019;16: 266-273.
27. Karakullukçu A, Kuşkucu MA, Ergin S, Aygün G, Midilli K, Küçükbaşmacı Ö. Determination of clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87(3): 291-294.
28. Günther F, Merle U, Frank U, Gaida MM, Mutters NT. Pseudobacteremia outbreak of biofilm-forming *Achromobacter xylosoxidans* - environmental transmission. *BMC Infect Dis* 2016;16(1): 584.
29. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using the repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 1994;5(1): 25-40.
30. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43(1): 199-207.
31. Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 2011;49(10): 3616-20.
32. Fluit AC, Terlingen AM, Andriessen L, Ikawaty R, van Mansfeld R, Top J, et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. *J Clin Microbiol* 2010;48(11): 3979-89.
33. Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer AF, Goldenberger D. Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2011;49(4): 1549-55.
34. Ussery DW, Binnewies TT, Gouveia-Oliveira R, Jarmer H, Hallin PF. Genome update: DNA repeats in bacterial genomes. *Microbiology* 2004;150: 3519-3521.
35. Ishii S, Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol* 2009;11(4): 733-40.
36. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19: 6823-6831.
37. Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic JV, De Bruijn FJ. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting, pp: 611-644. In: GA Kowalchuck, FJ De Bruijn, IM Head, ADL Akkermans, JD Van Elsas (eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2008. Dordrecht, the Netherlands: Springer.
38. Poonchareon K, Pulsrikarn C, Nuanmuang N, Khamai P. Effectiveness of BOX-PCR in Differentiating Genetic Relatedness among *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:- Isolates from Hospitalized Patients and Minced Pork Samples in Northern Thailand. *Int J Microbiol* 2019;2019: 5086240.
39. Peltier F, Choquet M, Decroix V, Adjidé CC, Castelain S, Guiheneuf R, et al. Characterization of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST607-K25 clone responsible for a nosocomial outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Med Microbiol* 2019;68(1): 67-76.
40. Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *J Endod* 2017;43(3): 377-382.
41. Cartelle Gestal M, Zurita J, Gualpa G, Gonzalez C, Paz Y Mino A. Early detection and control of an *Acinetobacter baumannii* multi-resistant outbreak in a hospital in Quito, Ecuador. *J Infect Dev Ctries* 2016;10(12): 1294-1298.
42. Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Sci Rep* 2016;6: 38929.
43. Hashemi A, Baghbani-Arani F. The effective differentiation of *Salmonella* isolates using four PCR-based typing methods. *J Appl Microbiol* 2015;118(6): 1530-40.
44. Waturangi DE, Joanito I, Yogi Y, Thomas S. Use of REP- and ERIC-PCR to reveal genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* from edible ice in Jakarta, Indonesia. *Gut Pathog* 2012;4(1): 2.
45. Lee CM, Sieo CC, Cheah YK, Abdullah N, Ho YW. Discrimination of probiotic *Lactobacillus* strains for poultry by repetitive sequenced-based PCR fingerprinting. *J Sci Food Agric* 2012;92(3): 660-6.
46. Lin CW, Chiou CS, Chang YC, Yang TC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Lett Appl Microbiol* 2008;47(5): 393-8.
47. Tacão M, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005;88(2): 173-9.
48. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43(8): 3615-23.
49. Rahmati A, Gal M, Northey G, Brazier JS. Subtyping of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction (PCR) ribotype 001 by repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting. *J Hosp Infect* 2005;60(1): 56-60.