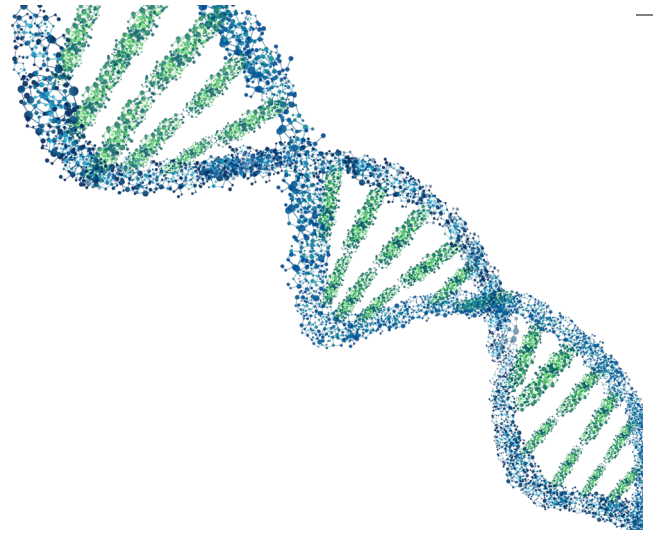


BÖLÜM 26

PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ



Özgen ESER¹

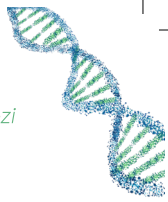
Bakteri tiplendirme yöntemleri, bakteri suşlarını birbirinden ayırt etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemler, salgınların belirlenmesinde, sürveysans ve filogenetik çalışmalarda önemli bir tanı aracıdır. Bakteri fenotipine dayalı olan antibiyotik direnci, serotiplendirme, faj tiplendirmesi, biyotiplendirme, multilokus enzim elektroforezi gibi yöntemlere göre ayırt edicilik gücü yüksektir. Moleküller biyolojide yaşanan gelişmeler DNA'nın stabil yapısı nedeniyle fenotipik yöntemlere göre daha hızlı ve daha az emek yoğun olan DNA temelli tiplendirme yöntemlerinin popüleritesini artırmıştır¹. Bu yöntemlerin epidemiyolojik analizlerde kullanılmaya başlanması moleküler epidemiyoloji kavramını ortaya koymuştur.

Bakteri genomu, hücrenin en temel moleküller kimliğidir. Epidemiyolojik analizlerde, plazmit analizi birinci kuşak, restriksiyon enzim ve problemleri ikinci kuşak, "pulsed field" jel elektroforez (PFGE) yöntemi üçüncü kuşak ve dizi analizi ise dördüncü kuşak moleküler yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir². Bakteri tiplendirmesinde her üç kuşakta yer

alan bu yöntemlerin hepsinde agaroz jel elektroforezi kullanım gereksinimi vardır³.

DNA moleküllerinin ayırımı sağlamak amacıyla uygulanan en önemli yöntemlerden biri kolaylıkla uygulanabilmesi ve çok amaçlı olması nedeniyle jel elektroforezidir. Elektroforez yöntemi hem protein hem nükleik asitlerin ayırımında yaygın kullanım alanı bulmuştur. Gen haritalama ve DNA dizileme yöntemlerinin uygulanması sırasında jel elektroforez yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur. Konvansiyonel jel elektroforez agaroz veya poliakrilamid katı bir matriks içinde, statik elektrik alanı altında, DNA moleküllerinin göçünü gerçekleştiren bir yöntemdir. Konvansiyonel jel elektroforez sistemi ile 100-200 baz çifti [base pair (bp)] büyüklüğünden 50 kilobaz (kb) çifti büyüklüğüne kadar DNA parçalarının ayırt edilmesi mümkün olabilmektedir. Büyüklüğü >50 kb olan DNA parçaları, bu yöntemle jelde yürüyememektedir⁴. Belli aralıklarla elektriksel alanın yer değiştirmesi sonucu DNA'nın göçü ile daha küçük moleküller büyük moleküllere göre daha kısa sürede

¹ Prof. Dr. Özgen Eser, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., ozgen.eser@hacettepe.edu.tr



ları ayırt etme gücü düşük kalabilmektedir. Dizileme yöntemlerine göre elde edilen verilerin uluslararası aktarımında nispeten zorluk bulunmaktadır.

PFGE Yöntemi ve Gelecek

PFGE yöntemi, bakteriyel tiplendirmede "altın standart" yöntem olarak kabul edilmesinin ardından uluslararası alanda paylaşılan standardize protokoller ile enfeksiyon kontrolünde, salgının belirlenmesinde ve gıda güvenliğinin sürveyansında moleküler tiplendirme yöntemleri arasında öncü rol üstlenmiştir. Tam genom analizinin kullanıma girmesi ile PFGE yöntemi uluslararası alanda özellikle filogenetik çalışmalarda popüleritesini kaybetmesine rağmen, halen daha düşük ölçekli laboratuvar ve hastanelerde salgının belirlenmesinde ve enfeksiyon kontrolünde en çok başvurulan tiplendirme yöntemleri arasında yerini korumaktadır.

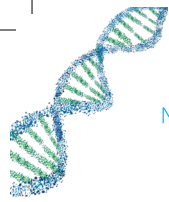
Yakın geçmişte tiplendirme yöntemlerinde otomasyona dayalı gelişmelerin artışı ve biyoinformatik analizlerin kullanıma girmesi ile bakterilerin tiplendirilmesinde belirgin bir teknik iyileşme gözlenmiştir. Dizilime ve DNA "microarray" profillerini içeren genotiplendirmeler sonucu, veri tabanlarının giderek genişlemesi daha kolay ve hızlı şekilde laboratuvarlar arası karşılaştırma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu durum, bakteriyel enfeksiyonlarda retrospektif analizin ve uzun süreli epidemiyolojik sürveyansın yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak, günümüzde halen ideal bir tiplendirme yöntemi bulunmamaktadır. Her bir yöntemin olumlu ve olumsuz yönleri bulunmaktadır. Bu nedenle, yöntemin karar verilmesinde uygulama alanı (yerel, ulusal, uluslararası) önem taşımaktadır. MLVA, "multilocus sequence typing (MLST)", DNA microarray ve dizileme yöntemleri çok kısa sürede sonuç veren tiplendirme yöntemleri olmakla birlikte, birçoğu deneyimli eleman ve pahalı ekipman gerektirmektedir. Bu yöntemlerin tek bir laboratuvar da kurulması nispeten kolay olsa dahi, ulusal veya uluslararası sürveyans ağının oluşturulması için birçok laboratuvarın aynı anda yeni yöntemi uygulaması ve yeni yöntemin validasyonunun gerçekleştirilmesi uzun yıllar alacak bir süreci gerektirmektedir. Ayrıca, yeni yöntemin uy-

gulanmasına karar verilmesi halinde eski yöntemle elde edilen tüm verilerin yeni oluşturulacak veri tabanına aktarılabilir olması gerekmektedir.

Yakın gelecekte rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tam genom dizileme yöntemlerinin PFGE yönteminin yerini alması maliyet etkin olmamaları nedeniyle beklenmemektedir. Öte yandan, özellikle sanayileşmiş ülkelerde bu yöntemlerin yaygınlaşması geleneksel yöntemlerin optimizasyonuna ve geliştirilmesine olumsuz etki edecektir.

Kaynaklar

1. Adzitey F, Huda N, Ali GR. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *Biotech* 2013;3(2): 97-107.
2. Goering RV. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present, and future. *Rev Med Microbiol* 2000;11: 145-152.
3. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol* 2010;10(7): 866-875.
4. Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* 1989;7(1): 34-42.
5. Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. New techniques for purifying large DNAs and studying their priorities and packaging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XLVII*: 189-195, 1982.
6. Levene SD. Methods in Molecular Biology, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, pp: 345-365. In: M. Burmeister and L. Ulmanovsky, Totowa, NJ (eds), The Humana Press. 1992.
7. Wagner L, Lai E. Separation of large DNA molecules with high voltage pulsed field gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1994;15(8-9): 1078-83.
8. Gardiner K. Pulsed field gel electrophoresis. *Anal Chem* 1991;63(7): 658-65.
9. Alam M, Islam MT, Rashed SM, Johura FT, Bhuiyan NA, Delgado G, et al. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J Clin Microbiol* 2012;50(7): 2212-6.
10. Alam M, Rashed SM, Mannan SB, Islam T, Lizarraga-Partida ML, Delgado G, et al. Occurrence in Mexico, 1998-2008, of *Vibrio cholerae* CTX+ El Tor carrying an additional truncated CTX prophage. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(27): 9917-22.
11. Larsen F, Gundersen G, Prydz H. Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *Genet Anal Tech Appl* 1992;9(3): 80-5.
12. Pirš M, Cerar Kišek T, Križan Hergouth V, Seme K, Mueller Premru M, Jeverica S, et al. Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia 2014-2016. *J Hosp Infect* 2019;101(2): 142-149.
13. Kevat A, Carzino R, Massie J, Harrison J, Griffiths AL. Elimination of Australian epidemic strain (AES1) *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol* 2018;53(11): 1498-1503.



14. Sharapov UM, Wendel AM, Davis JP, Keene WE, Farrar J, Sodha S, et al. Multistate Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006. *J Food Prot* 2016;79(12): 2024-2030.
15. Jackson KA, Stroika S, Katz LS, Beal J, Brandt E, Nadon C, et al. Use of whole genome sequencing and patient interviews to link a case of sporadic Listeriosis to consumption of prepackaged lettuce. *J Food Prot* 2016;79(5): 806-9.
16. <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/laboratory-molecular-typing-lmt/pulsed-field-gel-electrophoresis-pfge-typing/>.
17. Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 1986 4;232(4746): 65-8.
18. Carle GF, Olson MV. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1984;12(14): 5647-5664.
19. Gardiner K, Patterson D. Transverse alternating electrophoresis. *Nature* 1988;331: 371-372.
20. Gardiner K, Laas W, Patterson D. Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somat Cell Mol Genet* 1986;12(2): 185-95.
21. Shortridge VD, Pato ML, Vasil AI, Vasil ML. Physical mapping of virulence-associated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by transverse alternating-field electrophoresis. *Infect Immun* 1991;59(10): 3596-603.
22. Bancroft I, Wolk CP. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). *Nucleic Acids Res* 1988;16(15): 7405-7418.
23. Birren BW, Lai E, Clark SM, Hood L, Simon MI. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res* 1988 11;16(15): 7563-82.
24. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986;234(4783): 1582-5.
25. Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* 1989;7(1): 34-42.
26. Basim, E., Basim, H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol* 2001;25: 405-418.
27. Cantor CR, Gaal A, Smith CL. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 3. Effect of electrical field shape. *Biochemistry* 1988;27(26): 9216-21.
28. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984;37(1): 67-75.
29. Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem* 2019;573: 17-29.
30. Goering RV. Pulsed-field gel electrophoresis, pp: 185-196. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tank Y, Unger B, Relman DA, White TJ (eds), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2014. ASM Press, Washington, D.C.
31. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 Suppl 3: 1-46.
32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18(6): 426-39.
33. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9): 2233-39.
34. Bhagwat AS. Restriction enzymes: properties and use. *Methods Enzymol* 1992;216: 199-224.
35. McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1987;15(15): 5985-6005.
36. Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992;30(3): 577-80.
37. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 2006;3(1): 59-67.
38. Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol* 2019;74: 103935.
39. PulseNet. Alternate DNA stains – results and recommendations, in *PulseNet: under the Microscope, Vol 2*. Available from PulseNet.org <http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/Underthemicroscope/pulsenettipsvol2.pdf>. Accessed 13 February 2019.
40. Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2005;43(11): 5483-90.
41. Tseng D, Lee Y. Automatic band detection on pulsed-field gel electrophoresis images. *Pattern Anal Appl* 2014;18(1): 145-155.
42. Duck WM, Steward CD, Banerjee SN, McGowan JE Jr, Tenover FC. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J Clin Microbiol* 2003;41(7): 3035-42.
43. Swaminathan B, Gerner-Smith P, Ng L, Lukinmaa S, Kam K, Rolando S, et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodb Pathog Dis* 2006;3(1): 36-50.
44. Cookson B; HARMONY participants. HARMONY—the International Union of Microbiology Societies' European Staphylococcal Typing Network. *Euro Surveill* 2008;13(19): 18860.
45. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(2): 112-9.
46. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30(4): 967-73.
47. Gardiner K. Pulsed field gel electrophoresis. *Anal Chem* 1991;63(7): 658-65.
48. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* 2009;62(5): 372-7.
49. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 2013;18(4): 20380.