

## Bölüm 5

# SALGIN ARAŞTIRILMALARINDA MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA KULLANILAN KONVANSİYONEL ve MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Cansu ÖNLEN GÜNERİ<sup>1</sup>

Mikroorganizmalara bağlı olarak gelişen salgınlar önemli morbidite ve mortalite sebebi olmaları nedeniyle toplumsal sağlığı açısından risk teşkil etmektedir. Bu salgınların analizinde ve önlenmesinde başta mikrobiyoloji uzmanı olmak üzere epidemiyolog, enfeksiyon hastalıkları uzmanı ve diğer klinik branş uzmanlarına önemli görevler düşmektedir. Bu bağlamda laboratuvarlarda çeşitli tanısal testler kullanılmaktadır. Birçok alanda olduğu gibi laboratuvar alanında da teknolojinin hızlı gelişimi sonucu tanısal yöntemlerde birçok gelişmeler yaşanmış ve yeni teknikler ortaya çıkmıştır. Uzun zamandır kullanılan konvansiyonel yöntemlerin bazı parametreleri karşılamadığı yönünde görüşler bildirilmiş olsa da hala tanısal testlerdeki önemini korumaktadır. Ayrıca son 20-30 yıla damgasını vuran moleküler testler geliştirilmiş ve hem medikal hem de toplumsal alanda önemli avantajlar sağlamaya başlanmıştır. Bu bölümde konvansiyonel ve moleküler yöntemlerin salgın araştırmalarındaki yeri, avantajları, dezavantajları ve birbirlerine olan üstünlükleri ele alınmıştır.

### 1. KONVANSİYONEL YÖNTEMLER

Salgın araştırmalarında başvuru konvansiyonel yöntemler mikroorganizma tarafından genetik olarak eksprese edilen biyokimyasal, morfolojik ve biyolojik özellikleri belirler. Gen ekspresyonuna bağlı fenotipe yansıyan bu özellikler (hücre yüzey antijenleri, antimikrobiyal duyarlılık kalıpları, protein içerikleri ve bakteriyofaj tipleri gibi) dikkate alınarak izolatlar arasında epidemiyolojik bağlantı kurulabilir. Ancak, fenotipe yansıyan özelliklerin ortam koşullarından kolaylıkla etkilenmeleri sonucunda aynı atasal suşlar farklı özelliklere sahip olabilir ve farklı koloni morfolojisinde görülebilir. Hücre yüzey antijenleri/serotipleme ve faj tiplerinin ayırımında ise uygun antiserum/reaktan bulma zorluğu ve yöntemler

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi/Gülhane Sağlık Meslek Yüksekokulu /Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü/Tıbbi Laboratuvar Teknikleri PR

açısından standardizasyon problemi vardır. Bu sınırlayıcı faktörler yöntemlerin ayırım gücünü ve güvenilirliğini azaltmakta olup bir türün her bir suşunu ayırt etmek için yeterli olmadığını gösterir. Fakat bu sınırlamalara rağmen pek çok laboratuvar tarafından fenotipik yöntemler, özellikle antibiyotik duyarlılık testleri gibi salgın araştırmaları açısından önemini hala korumakta ve kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler, temelde geleneksel yöntemler ve proteine dayalı yöntemler olmak üzere iki başlık altında incelenir.

## **1.1. Geleneksel Yöntemler**

### **1.1.1. Biyotiplendirme**

Geleneksel yöntemlerden en eski method olan biyotipleme; mikroorganizmaların fizyolojik, biyokimyasal özellikleri ve metabolik aktivitelere göre ayrılmasına olanak tanır. Biyokimyasal testler ile etkene ait özellikler belirlenebilir. Ancak tür düzeyinde tanımla yapabilmek için gerekli test sayısının fazla olması; süre, maliyet ve iş gücünü arttırmaktadır. Biyokimyasal testlerle ayırımı zor olan bazı mikroorganizmalar açısından epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı sınırlıdır. Günümüzde bu yöntem otomatize sistemler ile tür tanımlanmasında rutin olarak kullanılır.

### **1.1.2. Antibiyotik Duyarlılık Profillerine Göre Tiplendirme**

Mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri, tekrarlanabilirliği yüksek, yorumlanması kolay ve standardize edilmiş yöntemlerdir. Özellikle spesifik izolatlarda antibiyotik direnç tespiti salgın kontrolü açısından erken uyarı sağlar. Ancak hareketli genetik elementler ile antibiyotik direnç genleri aktarılabileceğinden ilişkili olmayan izolatlar, aynı duyarlılık patternine sahip olabileceği gibi tam tersi durum da söz konusu olabilir. Bu nedenle epidemiyolojik tiplendirmede kullanımı sınırlıdır.

### **1.1.3. Serotiplendirme**

Hücre yüzey antijenlerinin özgül antiserumlarla reaksiyona girmesi prensibine dayalı serotiplendirme yöntemi (antikor bazlı testler) hücre yüzey antijenlerine göre subtiplere ayrılan Salmonella gibi patojenlerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Farklı serotiplere sahip her mikroorganizma için özgül antiserumun bulunma zorluğu, sınırlı sayıda bakteri türleri ve mantar grupları arasında ayırım yapmaları ve pahalı olması sebebiyle epidemiyolojik çalışmalar açısından yetersizdir.

#### **1.1.4. Faj Tiplendirme**

Bakteri hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bakteriyofaj adı verilen virüslerin bağlanıp hücreyi lize uğratması ve farklı suşlarda farklı reseptörlerden kaynaklı farklı lizis profilillerinin izlenmesi prensibine dayalı yöntem, faj tiplendirme olarak tanımlanır. Günümüzde bakteriyel türler arasında ayırım yapmak için kullanılmaya devam etmektedir. Fakat bakteriyofajların her laboratuvarında bulunma zorluğu, tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve yoğun iş gücü gerektirmesi dolayısıyla epidemiyolojik amaçlı kullanımı yaygın değildir.

### **1.2. Proteine Dayalı Yöntemler**

#### **1.2.1. Multi-locus Enzim elektroforezi (MLEE)**

Proteinleri kodlayan yapısal genlerin sekansını yansıtan dolayısıyla bu proteinlerdeki polimorfizmi izlemeye dayalı fenotipik bir yöntemdir. MLEE yöntemi, aynı gen lokusunun (metabolik enzim lokusu) farklı allellerinin gen ürünlerinin elektroforetik hareketliliklerindeki farklılıklar yoluyla allelik varyasyonlarını ortaya koyar. Elektroforetik hareketlilik proteinin net yüküne bağlıdır. Taksonomik çalışmalar ve aynı tür içindeki suşların evrimsel açıdan karakterizasyonunda oldukça etkili bir yöntemdir; ancak epidemiyolojik araştırmalar için tek başına yeterli ayırıcı güce sahip değildir. Bu sebeple özellikle uzun süreli epidemiyolojik araştırmalarda MLEE yöntemi ile belirlenen metabolik enzim lokusundaki allellik varyasyonlarının Multilocus Sequence Typing (MLST) ile aynı gen lokuslarına ait sekans tiplerinin karşılaştırılması ayırım gücünü artırır.

#### **1.2.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)**

Elektroforetik bir ortamda bakteriyel proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması prensibine dayanan bir yöntem olup, proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyon vb. etkenlerin sonucunda eksprese edilen gen ürünlerindeki değişimin izlenmesine olanak tanır. Hücre protein profillerinin tespiti ile çok sayıda yakından ilişkili suşun karşılaştırılması ve gruplandırılması mümkün olup epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılan standardize edilmiş önemli bir yöntemdir. Ancak bakteriye ait birçok farklı protein bandlarının oluşması ayırım ve yorum güçlüğüne sebep olur.

#### **1.2.4. İmmünblot Profil Analizi (Western Blot)**

Western immünoblotlama tekniği, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılan protein antijenlerinin nitroselüloz membrana blotlanması ve monoklonal antikorlar kullanılarak humoral bağışıklığın kromoje-

nik substratlarla değerlendirilmesine dayanır. Bu teknik daha çok bazı enfeksiyöz hastalık ajanlarına karşı spesifik antikorların tespiti için kullanılır.

Genel olarak; çevresel faktörlere bağlı olarak enfeksiyon etkenlerinde kararsız antijenik özelliklerin varlığı ve etkene ait değerlendirilmekte olan karakteristiğın ekspresyonunu öngörülebilir şekilde değiştirmesi protein analizine dayalı yöntemler açısından sınırlayıcı faktörlerdir.

Günümüzde bakteri ve mantar enfeksiyon etkenlerinin türler arası ayırımında biyokimyasal profile dayalı biyotipleme hızlı ve güvenilir teşhis yöntemleri sağlar. Fakat genel olarak epidemiyolojik tiplendirme amacıyla gerekli olan genetik bilgiyi sağlamaz. Dolayısıyla moleküler yöntemler bu anlamda oldukça değerlidir.

## **2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

Salgın araştırmalarında kullanılan DNA-bazlı teknikler genellikle restriksiyon enzimleri veya endonükleazlar tarafından nükleik asitlerin bilinen gen bölgelelerinden kesilmesi ve elde edilen DNA fragmentlerindeki değişimlerin izlenmesine veya nükleik asit amplifikasyonu ile elde edilen amplikonun araştırılması prensibine dayanır ve bir türe ait suşların evrimsel açıdan yakınlık derecesini belirler. Bu gibi durumlarda salgın suşu verileri için kütüphane/veri havuzları oluşturulur ve bu veri havuzları uzun süreli epidemiyolojik sürveyans çalışmalarında, önleyici stratejilerin belirlenmesini, patojenlerin ve antibiyotik direncinin gelişiminin izlenmesini mümkün kılar. Ayrıca, mikroorganizmaların moleküler epidemiyolojik ilişkilerine ait bilgilerin bulunduğu bu veri havuzu sistemi ile patojen etkene ait ulusal ve uluslararası yayılım haritası oluşturulup pandemik, epidemik ve endemik klonların global yaygınlığının izlenmesi sağlanır. Salgın durumunda araştırılan izolatların epidemiyolojik yönden ilişkili bulunabilmeleri için aynı genotipe sahip olmaları gerekir. Fakat mutasyon ihtimali, hareketli genetik elementlerin varlığı ve kullanılan moleküler yöntemin ayırım gücünün düşük olması gibi bazı durumlarda ilişkili izolatların klonal olarak farklı veya tam tersi durum söz konusu olabilmekte ve farklı moleküler tiplendirme yöntemlerine yönlendirmektedir. Bu amaçla kullanılan pek çok moleküler yöntemin birbirlerine olan üstünlüklerinin bilinmesi epidemiyolojik yönden ilişkili izolatların doğru araştırılması açısından kolaylık sağlar.

Günümüzde enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların tespitinde; basit plazmid analizinden, tüm genom dizilemesi (Whole Genom Analyses (WGS)) yöntemine kadar uzanan çeşitli teknikler kullanılır.

### **2.1. Plazmid Analizi**

Plazmide sahip organizmaların özellikle direnç ve virülans genlerinin yayılımının incelenmesinde basit ve düşük maliyetli ilk kullanılan yöntemlerden biridir. Yöntemin ayırım gücünü arttırmak ve büyük plazmidlerin ayırımını sağlamak için restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılır.

### **2.2. PCR-Restriction Fragment Length Polymorfizm (PCR-RFLP)**

Bilinen gen bölgesinin amplifikasyonuna ve amplikonların restriksiyon enzimleriyle kesimine ve farklı bant profillerinin polimorfizminin izlenmesine dayanan özellikle bakteriyel ve viral genom üzerinde etkili bir yöntemdir. Enfeksiyöz mantarlar gibi ökaryotik patojenler için etkili değildir. Pulsed Field Gel Electroforesis (PFGE) ile kullanımında daha etkilidir.

### **2.3. Ribotipleme**

Ribozomal RNA'yı kodlayan korunmuş gen bölgelerindeki polimorfizminin RFLP analizi ile tespitine ve elektroforez ile elde edilen bantların Southern blotlama tekniği ile membrana aktarılması işlemlerini kapsar. İşlem basamakları fazla olan ve yoğun emek gerektiren bir yöntemdir. Korunmuş gen bölgelerinin ve restriksiyon enzimlerinin sayısının fazla olması yöntemin ayırım gücünü artırır. Otomatize sistemlerde bu teknik kullanılmaktadır.

### **2.4. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

RAPD'ın temel prensibi, bilinen gen bölgelerinin kısa primerlerle rastgele amplifikasyonudur. Primerlerin bağlanma bölgeleri arada kalan çoğaltılacak dizileri ve jel elektroforezi ile farklı uzunluk ve boyutlardaki bant profilini belirler. Ayırım gücü iyi olmasına rağmen; tekrarlanabilirliğinin düşük ve bant profillerini yorumlama açısından standardizasyonun sağlanamamış olması sebebiyle büyük çaplı salgın ve epidemiyolojik sürveyans araştırmalarında tercih edilebilirliği sınırlıdır. Daha çok küçük çaplı salgın ve spesifik sınırlı epidemiyolojik araştırmalarda tercih edilir.

### **2.5. Repetitive Element Palindromic-PCR (Rep-PCR)**

Bakteriyel genomda tekrarlayan gen dizilerini hedef alır. Tekrarlanan gen dizileri arasında yer alan bölgelerin suşlar arası farklılık veya benzerlikleri baz alınarak agaroz jel elektroforezi ile oluşan bant profillerinin izlenmesine ve karşılaştırılması prensibine dayanır. Sınırlı uygulanabilirliğe sahiptir; ancak RAPD'a göre tekrarlanabilirliği daha yüksek ve bant yorumlamasında standardize edilmesi sebebiyle yerel epidemiyolojik sürveyans çalışmalarında tercih edilebilirliği daha yüksektir.

## **2.6. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA parçalarının adaptörlerle işaretlenmesi ve iki basamaklı amplifikasyon işlemi sonucu poliakrilamid jel elektroforezinde bant profillerin izlenmesi prensibine dayanır. Yöntemin işlem basamakları fazla olmasına rağmen; ayırım gücü yüksektir. Salgın gözetimi ve sürveyans araştırmalarında subtiplerin belirlenerek yerel veri havuzu oluşturulması açısından uygun bir yöntemdir.

## **2.7. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

PFGE yöntemi tüm bakteriyel genomun restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda elektroforez sırasında akım yönünü ve süresini belirli aralıklarla değiştirerek 40-1000 kilobazlık büyük fragmentlere ayırması prensibine dayanır. Büyük DNA fragmentlerinin elde edilmesinin sebebi genomda seyrek olarak görülen tanıma bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve dolayısıyla fragment sayısının az olmasıdır. Genomda enzim tanıma bölgelerinde değişim olması durumunda (mutasyon gibi) oluşan bant sayısı ve büyüklüğü değişecek ve suşlar arasındaki yakınlık ilişkisi değerlendirilecektir. Yoğun iş gücü gerektiren, uzun süreli (2-4 gün) ve işlem basamakları oldukça fazla olan bir yöntemdir. Ayırım gücü çok yüksek olup, moleküler tiplendirmede altın standart olarak kabul edilir. Tür düzeyinde uygulama alanı oldukça geniştir (neredeyse tüm bakteriler ve bazı funguslar). Özellikle salgın araştırmalarında oldukça kullanışlı olup sonuçları epidemiyolojik verilerle uyumludur ve sürveyans programlarında kütüphane veritabanları için değerli veriler sağlar.

## **2.8. Multilocus Sequence Typing (MLST)**

Bu yöntem; metabolik aktiviteden sorumlu yapısal genlerin (housekeeping genler) amplifikasyonuna ve oluşan ampikonların dizi analize dayanır. DNA dizi analizine dayalı ilk tiplendirme yöntemlerinden biridir. Yapısal genlerdeki farklı dizimler dikkate alınarak her bir tür için allellik profili ve sekans tipi belirlenir. Aynı allellik profile sahip izolatlar aynı atasal köken içinde değerlendirilir. Tekrarlanabilirliği ve tiplendirilebilirliği oldukça yüksektir. Özellikle filogenetik çalışmalar açısından oldukça değerli bir yöntemdir. Ancak ayırım gücü sınırlıdır. MLST yönteminin ayırım gücünü geliştirmek adına özellikle virülansla ilişkili genlerin kullanımına dayanan multi-virulence locus sequence (MLVA) yöntemi ve MLST sonuç şemalarını basitleştirilmesi amacıyla benzer filogenetik bilgiyi daha az ayırım gücüyle sunan Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) yöntemleri geliştirilmiştir.

## **2.9. PCR-DNA Sequencing**

Belirli bir gen bölgesinin nükleotid analizi prensibine dayalı oldukça duyarlı olan bir yöntemdir. Özellikle nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinin genotipik antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinde önemli bir tanı aracıdır.

## **2.10. Whole-genome sequencing (WGS)**

WGS özellikle salgın araştırmalarında PFGE ve MLST'den daha yüksek ayırım gücüne sahip yeni nesil bir yöntemdir. Epidemiyolojik çalışmalar için özellikle salgın tespiti ve kontrolünde patojenik ajanların hızlı tanımlanması, virülans ve ilaç direncine dair gen polimorfizmleri gibi gerekli olan neredeyse tüm genetik bilgiyi sağlar. Bununla birlikte, WGS tarafından üretilen büyük miktarda verinin klinik faydaya çevrilmesi hala geliştirilme aşamasındadır ve gelecekte mevcut moleküler tiplendirme tekniklerinin yerini alması muhtemeldir.

Sonuç olarak, moleküler tekniklerin sınırlı sayıda patojen tespiti, yanlış pozitif sonuçların alınabilmesi, aşamalı örnek hazırlama işlemleri, kurulum maliyetinin yüksek olabilmesi, standart yorumlama kriterlerinin olmaması, özel ekipman, yüksek teknoloji ve eğitim gerektirmesi gibi dezavantajları olmasına rağmen özellikle salgın araştırmalarının vazgeçilmezi olan epidemiyolojik incelemelerde oldukça önemli yöntemlerdir.

## **KAYNAKLAR**

- Benbachir M.** (2018). Role of the microbiology laboratory in infection control. In Guide to Infection Control in Hospitals, Wenzel R., Bearman G., Brewer T., Butzler J.P. (Eds.), *International Society for Infectious Diseases.*, Boston.
- Buchan B., Ledebor NA.** Emerging technics for the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014;27:783–822.
- Cantón R.** Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. *Clin. Microbiol. Infect*, 2005;11(1), 3–8.
- Diekema D.J., and Saubolle M.A.** Clinical microbiology and infection prevention. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:57–60.
- Diekema, D.J., and Pfaller, M.A.** (2007). Infection control epidemiology and clinical microbiology. In Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., and Pfaller M. A. (Eds.), *Manual of clinical microbiology*, (9th ed., pp.118-128) ASM Press, Washington, DC.
- Haşcelik G.** Hastane enfeksiyonlarında laboratuvarın rolü. *Hast. İnfekt. Der.*1997;1:21-30.
- Herwaldt M.A., Pfaller M.A., Weber S.** (2001). Microbial Molecular Techniques. In: Thomas JC. (Eds), *Epidemiologic Methods for the Study of Infectious Diseases.* (6th ed. pp: 163-192). Oxford University Press.
- Köksal F.** Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarında kullanımı. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi.* 1999;3:189-195.
- Murray P.,R.** (2015). The Clinician and the Microbiology Laboratory. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (8th ed., pp. 191–223), Washington, DC.
- Pfaller, M.A., and Diekema D.J.** (2014). The Role of the Laboratory in Prevention of Healthcare-Associated Infections. In William JR. (Eds.), *Bennett and Brachman's Hospital infections.* (6th ed. pp: 119-139). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

*Mikrobiyolojide Güncel Konular II*

- Singh A., Goering R.V., Simjee S., Foley S.L., Zervos M.J.** Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19:512-530.
- Soll D.R., Lockhart S.R., Pujol C.** (2003). Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In Murray PR. (Eds.), Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover R.H., *Manual of clinical microbiology.* (8th ed. pp: 139-161). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Stratton W., and Greene C.,G.** (2012) Role of the Microbiology Laboratory and Molecular Epidemiology. In: Mayhall CG (Eds), *Healthcare Epidemiology and Infection Control Hospital epidemiology and infection control.* (4th ed. pp: 1418-1431). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.