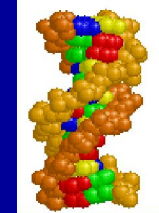
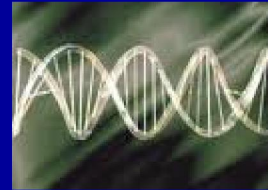


# BAKTERİYOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ



Prokaryotic Cell Structure

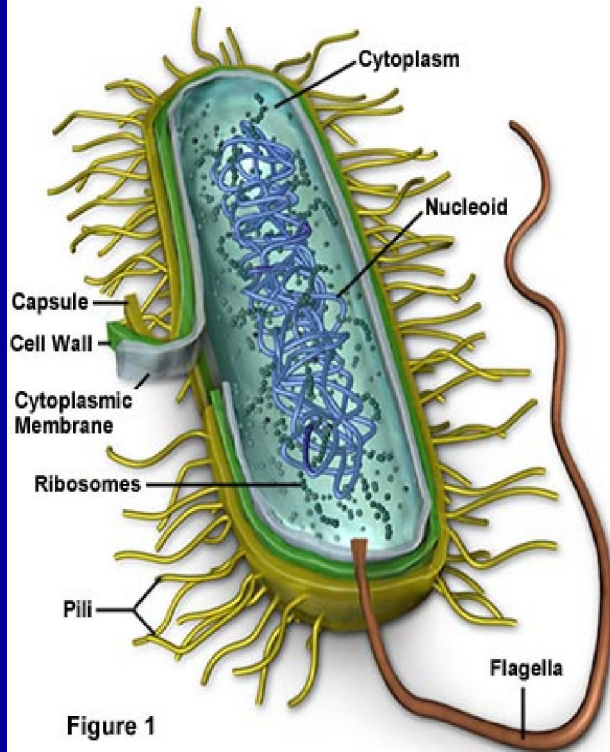
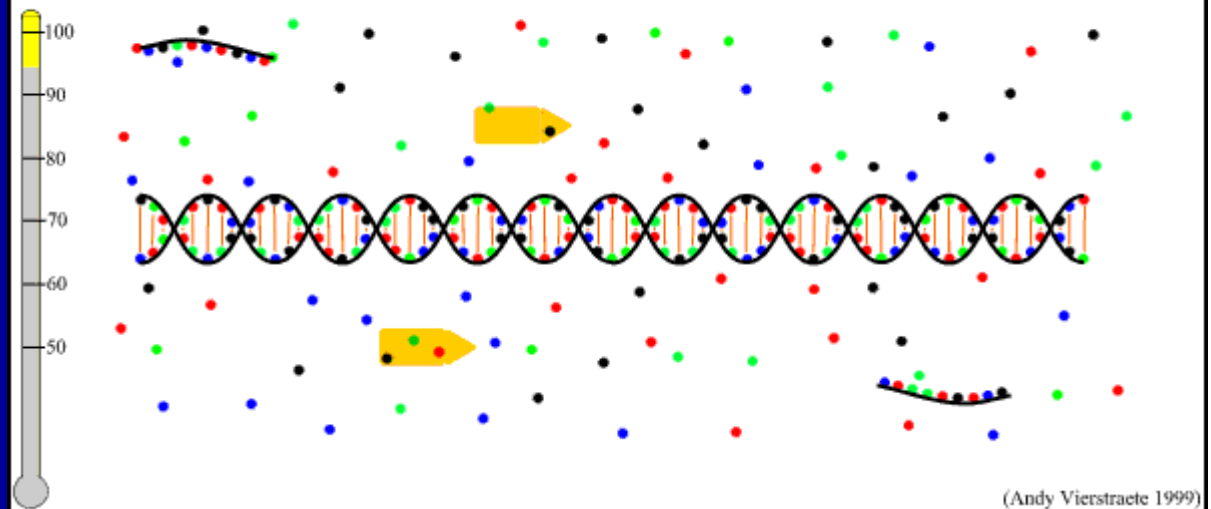


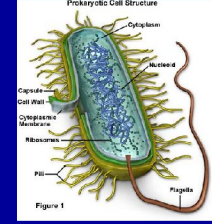
Figure 1

PCR : Denaturation 94°C





# Bakterilerin tanımlanması



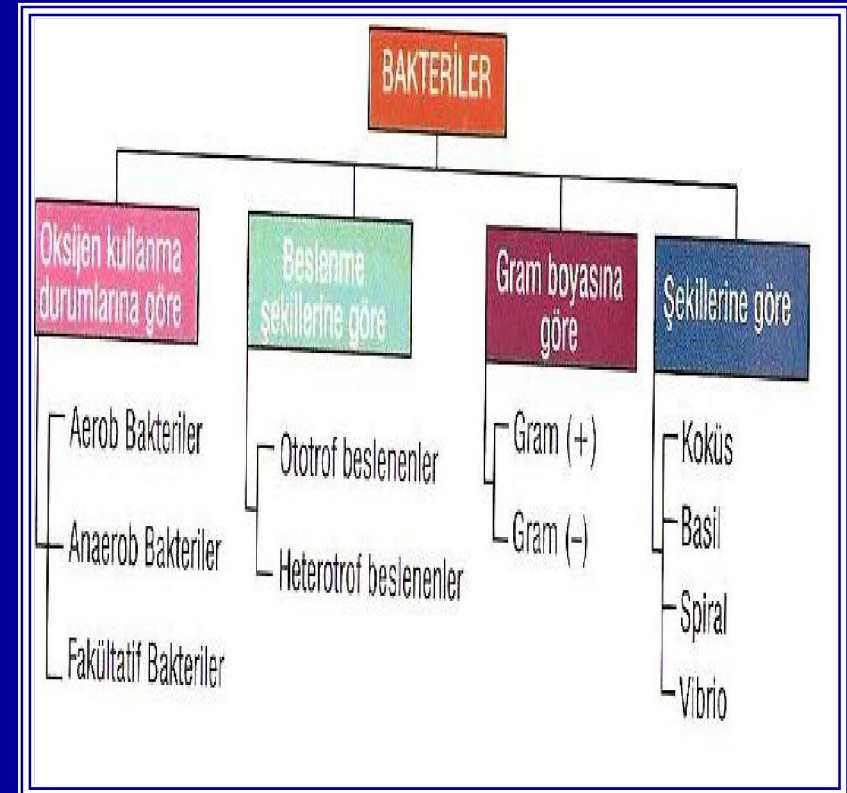
- Klinik mikrobiyolojide cins ve tür seviyesinde tanımlama morfolojik fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri test eden yöntemlere dayalıdır.

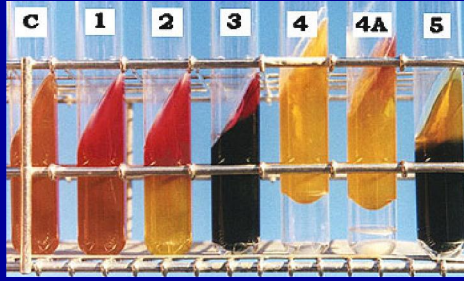
## Morfolojik özellikler

- Hücre şekli
- Spor
- Kirpik
- İnklüzyon cisimcikleri
- Gram boyanma özellikleri
- Koloni şekli, renk, büyüklük

## Fizyolojik ve Biyokimyasal özellikler

- Üreme ısısı
- pH
- Atmosfer koşulları,
- Tuz konsantrasyonu
- Enzimler
- Antimikrobiyallere direnç

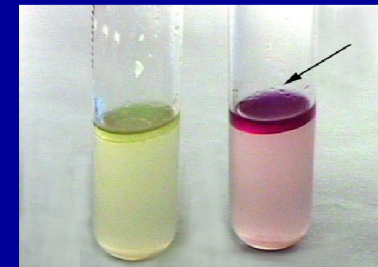
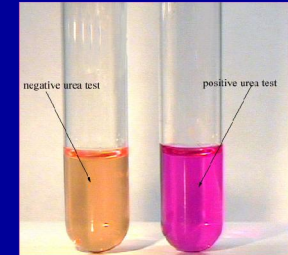
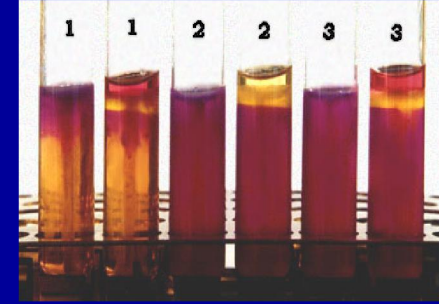




## Biyokimyasal Testler

- Hareket 37 °C
- Sarı pigment
- Kırmızı pigment
- MacConkey
- Katalaz
- Nitrat redüksiyonu
- Sitrat
- Üreaz
- Gelatin hidrolizi
- Dulsitol, Gliserol, Inositol, Laktoz,
- Maltoz Mannitol, Raffinoz,
- Rhamnoz, Salisin, Sorbitol, Sukroz
- Trehaloz, Xyloz Nişasta,
- VP
- Indole

- KCN
- H<sub>2</sub>S üretimi
- Glukonat
- Malonat
- ONPG
- PPA
- Arjinin dihidrolaz
- Lizin dekarboksilaz
- Ornitin dekarboksilaz
- Glukozdan asit oluşumu
- Glukozdan gaz oluşumu
- %0.4 selenit
- Kasein hidrolizi
- DNase
- Adonitol, Arabinoz, Sellobioz



Biyokimyasal testler için harcanan sürenin uzun olması, sonuçların zaman alıcı veya yanıltıcı olması ve diğer dezavantajlar fenotipe dayalı testlerin standart hale getirilmesinde sorunlara neden olmaktadır

- Genetik tiplendirmenin bu yöntemlere göre en önemli üstünlüğü kesin ve hızlı olmasıdır.
- Burada identifikasyon doğrudan doğruya canlının genomu baz alınarak yapıldığından fenotipik özelliklerde gördüğümüz çevresel şartlardan (beslenme, ısı, kültür yaşı, fizyolojik durum gibi) etkilenme söz konusu olmaz.

# SINIFLANDIRMADA GENOTİPİK YÖNTEMLER

- DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri
- (farklı bakterilerden iki DNA ipliği ne derece hibritleşebiliyor)
- Guanin+Sitozin molar yüzdesi (%G+C değeri)
- rRNA benzerlikleri
- DNA fingerprinting
  - Amplified-fragment length polymorphism (AFLP)
  - MLST
  - MLEA

- **DNA Dizi analizi** araştırması; yeni bulunan bir dizinin veritabanlarında bilinen tüm diğer dizilerle karşılaştırılması
- Bu yöntemle, dizi; benzerlikler ve protein kodlama potansiyeli yönünden araştırılarak genler belirlenir, gendeki mutasyonlar saptanır

- **16S rRNA** çok iyi korunmuş diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir.
- Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir.
- İdeali bakterinin kromozom DNA'sının tamamının sekansını karşılaştırmaktır
- Her suş için milyonlarca nükleotidin sekansının çıkarılması gerekmektedir.
- DNA dizi farklılığı gösteren bölgeler ise izolatları cins veya tür düzeyinde sınıflandıracak dizi polimorfizmleri taşır.
- Ancak 16S rRNA molekülündeki dizi farklılık derecesi, bazı çok yakın ilişkili türleri birbirinden ayırmaya yeterli olmayabilir.
- Bu durumda 23S rDNA 16S+23S rDNA, ITS (internal transcribed sequences) ve *groE1*, *rpoB*, *recA* ve *gyrB* gibi sürekli olarak transkribe olan diziler gibi diğer moleküler hedeflerde cins veya tür düzeyinde sınıflandırmada kullanılmaktadır.



- *Streptococcus* spp türlerinde ise 16S yerine 23S rRNA daha fazla kullanılmıştır.
- Bazı bakteri türlerini spesifik olarak ayırmada rRNA genlerinden daha iyi seçeneklerde vardır.  
Örn. *Mycobacteria*'da 65kDa luk bir ısı-şoku proteinini kodlayan gen;
- *Bartonella* ve *Rickettsia*'da sitrat sentetaz geni kullanılmıştır.
- Ancak taksonomik gruplandırma yapabilmek için hiçbir gen 16S rRNA kadar etkin değil.
- Özellikle amaç hiç bilinmeyen bir organizmayı tanımlamak ise ilk aşamada ribozomal RNA genleri uygun bir seçim olacaktır.



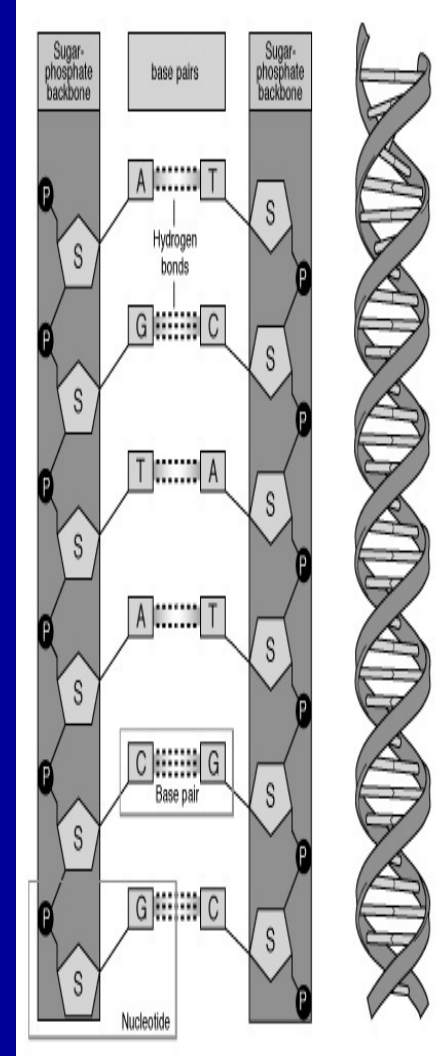
# DNA TESPİT VE ÇOĞALTMA YÖNTEMLERİ



1. Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri
2. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri
  - Hedef (target) amplifikasyon sistemleri (PCR)
  - Prob amplifikasyon sistemleri
  - Sinyal amplifikasyonu

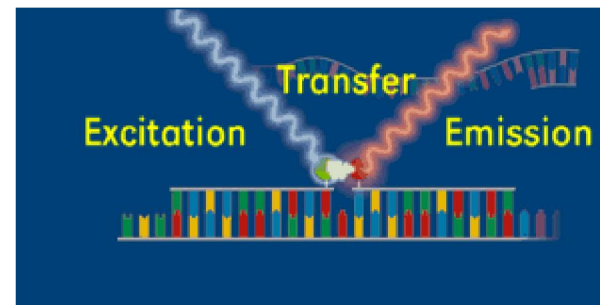
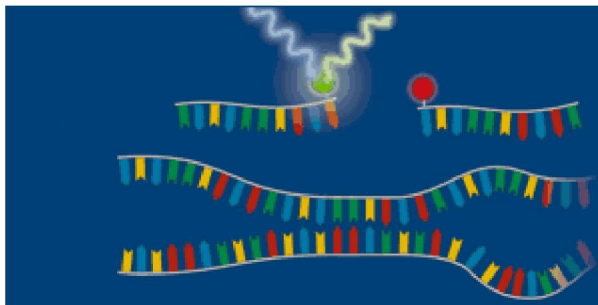
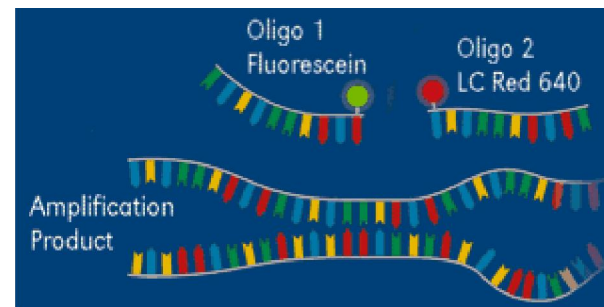
# Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri (1)

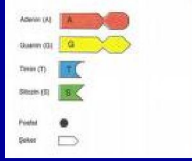
- Moleküler yöntemlerin en eski ve basit olanıdır
- Örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve tanı konulmaktadır
- Problar, 30-40 nükleotitten oluşmuş ve hedef dizinin karşıtı olarak laboratuvarında sentezlenmiş, sıklıkla bir dedektör molekülle işaretlenmiş oligonükleotidlerdir.
- DNA molekülü yeteri kadar ısıtılırsa çift iplikli heliks yapıyı tutan hidrojen bağları tahrip olur ve molekül tek sarmallı yapıya denatüre olur



# Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri (2)

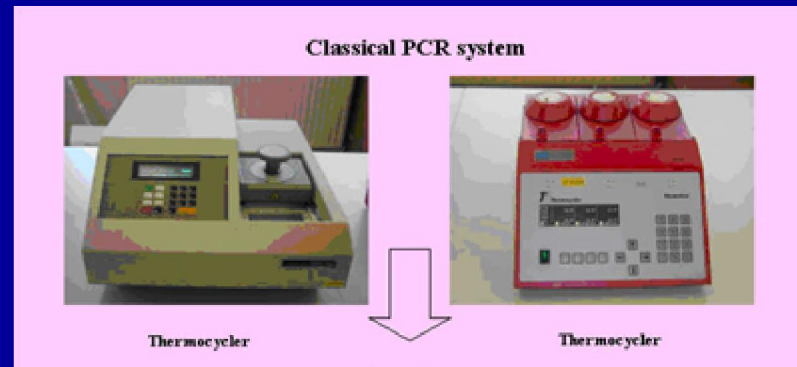
# Hibridizasyon

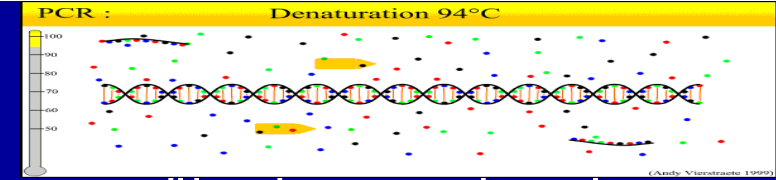




# POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) nedir?

- PCR, **nükleik asitlerin** in-vitro olarak, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır.
- DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir.





- **Denatürasyon:**

İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır.

Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.

(İlk denatürasyon tek siklus olarak 15 dakikaya kadar uygulanır)

- **Annealing (Bağlanma)**

Denatürasyonu takiben daha düşük ıslarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar.

47°C- 60°C arasında 30-60 sn 'de gerçekleşir.

(G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısı 68°C'ye kadar arttırılabilir)

- **Elongasyon (uzama)**

Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır.

Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişir.



- Termal ısı döngü cihazının bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar.
- Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve siklus sayısına bağlıdır. 25-40 siklus uygulanır.
- Klasik PCR normalde sayısal (kantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir

#### Overview of Kit Procedure

Add Lysis Solution to Tissue Sample



Incubate at 65°C for 10 min



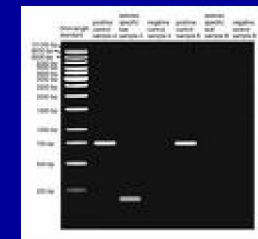
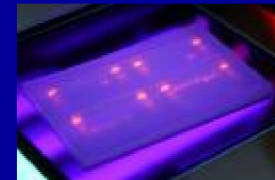
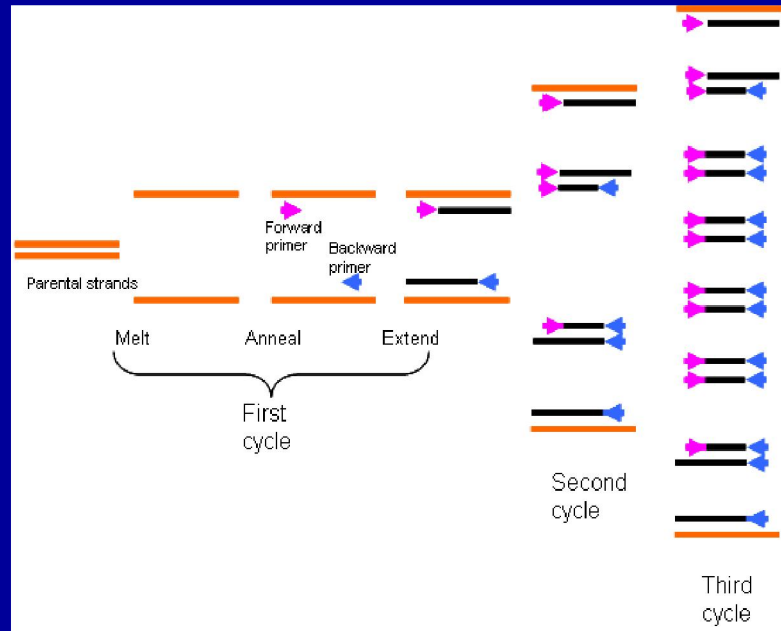
Add Neutralization Solution Set up PCR with a portion



Perform PCR

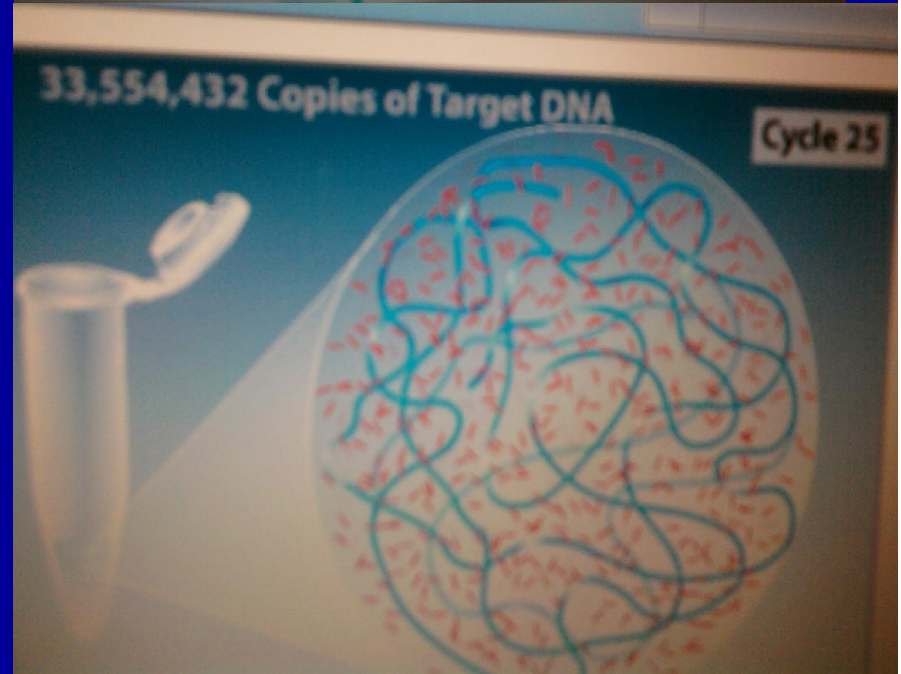
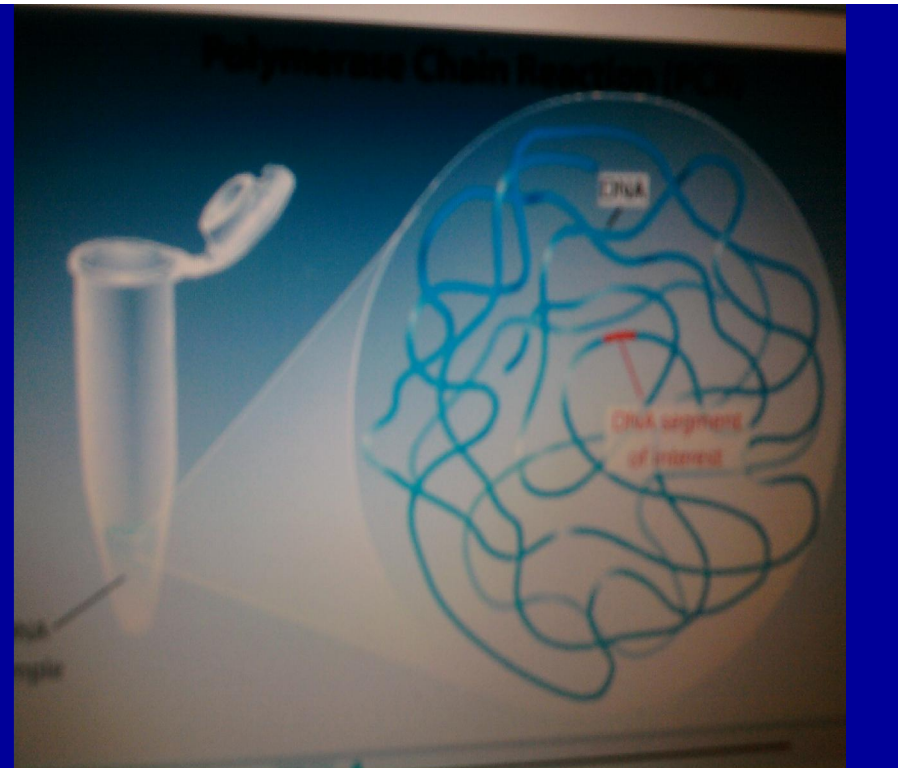


Gel electrophoresis





# PCR



# PCR TIPLERİ

- Revers-transkriptaz PCR
- In situ PCR
- Demirlenmiş (anchore PCR)
- Hot start PCR
- Multipleks PCR
- Yuvalanmış (Nested) PCR
- Touch-down PCR
- Consensus PCR
- Real-time PCR
- İmmuno PCR

# REAL-TIME PCR



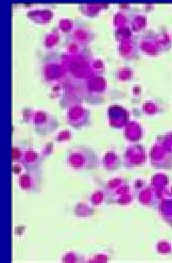
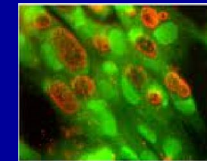
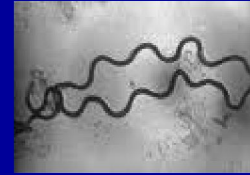
- PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemi oluşturmuştur.
- DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmektedir.
- Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır.
- Klinik uygulamaları giderek artan real-time PCR sistemleri, infeksiyon hastalıklarının tanısında ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir.

# PCR Yönteminin Bakteriyolojide Yaygın kullanıldığı Alanlar

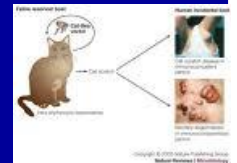
1. Tanıda süreyi kısaltmak veya kültürü yapılamayan bakterilerin oluşturduğu infeksiyonları tanımlamak
2. Antibiyotik almış olan hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma
3. Bakterilerin toksijenik suşlarının ayırt edilmesi
4. İnvaziv olmayan metotlar kullanarak erken tanı koyma
5. Bulaşıcı özelliği fazla olan patojenlerin araştırılması
6. Antimikrobiyal direncin saptanması
7. Patojen bakterilerin bulaşma şekillerinin ve kaynaklarının incelenmesinde

# 1-Tanıda süreyi kısaltmak veya kültürü yapılamayan bakterilerin oluşturduğu infeksiyonları tanımlamak

- *Mycobacterium leprae*
- *M.tuberculosis*
- *Treponema pallidum*
- *Chlamydia trachomatis*
  
- *Borrelia burgdorferi*
  
- *Coxiella burnetii*



İnfeksiyon	İncelenen örnek	Mikroorganizma
Atipik pnömoni	Yeni doğanlarda nazofaringeal yıkantı Balgam	<i>C.pneumoniae</i> <i>M.pneumoniae</i> <i>C.burnetti</i> <i>L.pneumophila</i>
Genital Klamidya inf.	Servikal ve üretral sürüntü	<i>C.trachomatis</i>
Erlişiyoz	Kan	<i>Ehrlichia</i>
Kedi ısırığı Hastalığı	Doku biyopsisi	<i>Bartonella henselae</i>



İnfeksiyon	İncelenen örnek	Mikroorganizma
Meningit	BOS	<i>N.meningitidis</i>
		<i>M.tuberculosis</i>
	Serum	<i>N.meningitidis</i>
Tüberküloz	Balgam	<i>M.tuberculosis</i>
	Diğer solunum yolu örnekleri	
	Perikardiyal efüzyon	
	BOS	
	İdrar	
Lepra	Doku biyopsisi	<i>M.leprae</i>



## *2-Antibiyotik almış olan hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma (1)*

- İnfeksiyon hastalıklarının çoğunda hasta antibiyotik almaya başladıktan sonra etkenin üretilerek tanı konulması zorlaşmaktadır.
- PCR yöntemiyle etkene ait genetik materyel araştırılarak klinik tanıya yardımcı olunabilmektedir.
- Meningokokal sepsis veya menenjitde hasta antibiyotik almış ise kültürde etken üretilemez.

Ancak, BOS veya kan örneklerinde PCR ile bakteriye ait genetik materyal gösterilerek tanı konulabilir.

## *2-Antibiyotik almış olan hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma (2)*

- Antitüberküloz ilaç alan hastaların balgamından yapılan kültürler negatif olduğu halde, PCR yöntemleriyle pozitif sonuçlar alınabilmektedir
- Saklanmış olan örneklerde bakteriyel genetik materyal PCR ile araştırılarak retrospektif çalışmalar yapılabilir
- Tüberküloz şüpheli veya kesin tanılı hastalara ait parafinize dokulara uygulanan PCR yöntemiyle tüberküloz basillerini göstermek mümkün olabilmektedir

# 3-Bakterilerin toksijenik suşlarının ayırt edilmesi (1)

- *Vibrio cholerae* suşlarında toksin üretimi hücre kültürü ve immünolojik yöntemler gibi klasik metotlarla araştırılabildiği gibi toksinin A alt ünitesini kodlayan gen bölgesini amplifiye eden PCR yöntemiyle de yapılabilmektedir
- Patojenik *E. coli*'ler  
ETEC tarafından oluşturulan Isıya dayanıklı ( ST I ve ST II) ve Isıya dayanıksız toksin (LT I, LT IIa, LT IIb),  
EHEC *Escherichia coli* O157:H7 serotipi, tarafından oluşturulan Verotoksin (VT1, VT2 ve VT2e) ve diğer virülans faktörlerinin tamamını (sitotoksik nekrotizan faktör,  
Verotoksin üreten *E. coli*" (VTEC) veya daha ender olarak "Shiga-benzeri Toksin üreten *E. coli*" (STEC) adları onun toksin üretme yeteneğine değinir.

## İshal yapan E. coli kokenlerini tanımlamak için kullanılan DNA problemleri

Escherichia coli fenotipi	Ozgul olduğu yapı	Ozgul olduğu yapı
EAEC	AA plazmidi	pCVD432 (1 kb EcoRI-PstI)
EPEC	eae geni	pCVD434 (1 kb Sall-KpnI)
DAEC (difüz aderans yapan)	EAF plazmidi	pJPN16 (1 kb BamHI-Sall)
EIEC	daaC geni	PLSM852 (390 bp PstI)
ETEC	İnvazyon	pPS2.5 (2.5 kb HindIII)
EHEC	LT enterotoksini	pCVD403 (1.2.kb BamHI)
	STp enterotoksini	pCVD426 (157 bp PstI)

## 3-Bakterilerin toksijenik suşlarının ayırt edilmesi (2)

- *Corynebacterium diphtheriae* ve
- *Clostridium difficile*'nin araştırılmasında, sitotoksin ve serolojik testler yanında PCR yöntemi de yaygın olarak kullanılmaktadır
- *S. aureus*'ların patogeneğinde etkili olan Enterotoksin, Eksfoliyatif toksin ve Toksik şok sendrom toksini-1'in gösterilmesi de mümkün olabilmektedir

## *4-İnvaziv olmayan metotlar kullanarak erken tanı koyma*

Herpes simpleks ensefalitinde beyin biyopsisine gerek kalmadan BOS' dan etken araştırılabilmektedir

## 5-Bulaşıcı özelliği fazla olan patojenlerin araştırılması

- *Brucella* ve *Francisella tularensis* gibi bulaşıcılığı fazla olan infeksiyonlarda, canlı bakterilerle çalışmayı gerektiren kültür yöntemlerinde laboratuvar personelinin infeksiyonu alma riski oldukça yüksektir.
- Moleküler yöntemler, ölü bakterilerle çalışıldığı için bulaşma riski ortadan kalkmaktadır



# 6-Antimikrobiyal direncin saptanması

- *M. tuberculosis* rifampisin direncinin saptanması

Rifampisin, RNA polimeraz enziminin  $\beta$  alt ünitesine bağlanarak transkripsiyon ve RNA'nın uzamasını engellemektedir.

Mikobakterilerdeki rifampisin direncinin *rpoB* geni tarafından kodlanan sınırlı sayıda amino asitte meydana gelen değişime bağlı olduğu anlaşılmıştır.

- PZR çalışmalarında *rpoB* geninin *Rif<sup>r</sup>*yi kodlayan bölgesinin amplifikasyonu ve sonra dizi analizi ile amino asit değişiklikleri gösterilebilmekte ve böylece 2-3 gün içerisinde rifampisine direnç belirlenebilmektedir

*M.tuberculosis* suşlarındaki *katG* geni ve *inhA* lokusu veya regülatör bölgesindeki nükleotit değişikliklerinin gösterilmesi ile izoniazid direnci

# ***Stafiokoklarda metisilin direncinin araştırılması***

- Metisilin direncinin en yaygın mekanizması *mecA* geninin bulunmasıdır.
- *mecA* geni yeni bir penisilin bağlayan protein olan PBP2A veya 2'(PBP 2') üretmekte ve beta laktam antibiyotiklerin bu proteine bağlanma affinitesinin düşük olması dirence neden olmaktadır.

# Direncin saptanmasında PCR testleri

- “**Multiplex**” PCR: *mecA*, *gyrA*, *nuc*, 16S rRNAs genlerinin saptanması
- Duyarlılık ve özgüllük %100
- *Zhang K et al. J Clin Microbiol 2004; 42 (11): 4947-55.*

# Enterokoklarda vankomisin direnci

- Özgül **Ligaz genleri**

VanA

VanB

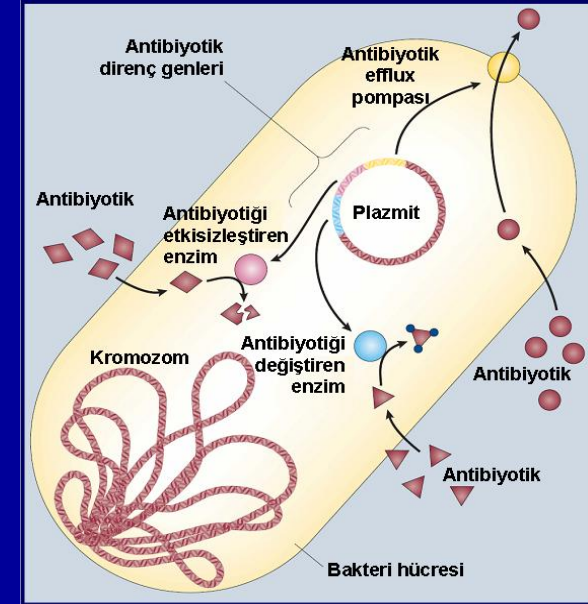
VanC

VanD

VanE

# Beta Laktam Antibiyotikler İçin Direnç Mekanizmaları

- Hücre içindeki Beta-laktam antibiyotiğin konsantrasyon azalması
  - Porin kaybı
  - Pompa sistemi
- Hedef bölgesindeki PBP değişimi
  - Mevcut PBP değişimi
- Beta-laktam antibiyotiğin parçalanması
  - Beta-laktamaz üretiminin artışı
  - Mevcut Beta-laktamaz yapısında mutasyon gelişimi
  - Farklı spektrumda yeni Beta-laktamaz genlerini kazanılması



# *E.Coli ve K.pneumoniae*'da Beta-Laktamazlar

Jacoby GA, et al. N Engl J Med, 2005; 352: 380-91

<b>Beta-Laktamaz</b>	<b>Örnek</b>	<b>Antibiyotikler</b>	<b>Klavulanata yanıt</b>	<b>Sınıf</b>
Geniş spektrumlu	TEM-1, TEM-2, SHV-1  OXA	Penisilinler, SS (dar spektrum)  Oksasilin..	+++	A D
GSBL	TEM, SHV CTX-M OXA Diğer (BES-1, VEB-1..)	Pen, Monobaktam, SS..  Sefepim	++++ ++++ + ++++	A D A
Amp C	ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY..	GSBL + sefamisinler	0	C
Karbapenemaz	IMP, VIM, GIM-1, SPM-1(MBL) KPC-1, 2, 3 OXA-23, 24, 25..	GSBL + sefamisinler + karbapenem	0 +++ +	B A D

## GSBL'lerin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler (1)

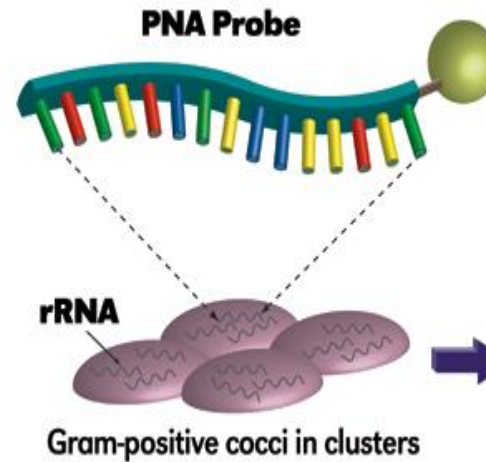
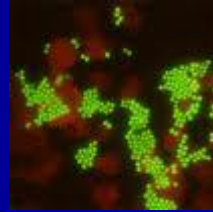
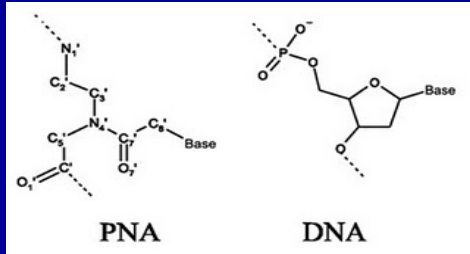
Test	Avantajlar	Dezavantajlar
DNA probları	Gen ailesine özgül (TEM, SHV)	Emek yogun, GSBL olanlar ve olmayanları ayırdetmez, TEM, SHV türevlerini ayırdetmez
PCR	Kolay, gen ailesine özgül	GSBL olanlar ve olmayanları ayırdetmez, TEM, SHV türevlerini ayırdetmez
Oligotiplendirme	Özgül TEM türevlerini saptayabilir	Özgül oligonükleotid probları gerekir, emek yogun, yeni türevleri saptayamaz

## GSBL'lerin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler (2)

Test	Avantajlar	Dezavantajlar
PZR-RFLP	Kolay, özgül nükleotid deęişiliklerini saptayabilir	Nükleotid değişiliklerinin saptanabilmesi için restriksiyon bölgesinde değişiklik olması gerekir
Dizi analizi	Altın standart, tüm türevleri saptayabilir	Emek-yogun, teknik olarak oyalayıcı, yorum güç olabilir



# PEPTIDE NUCLEIC ACID FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (PNA-FISH)



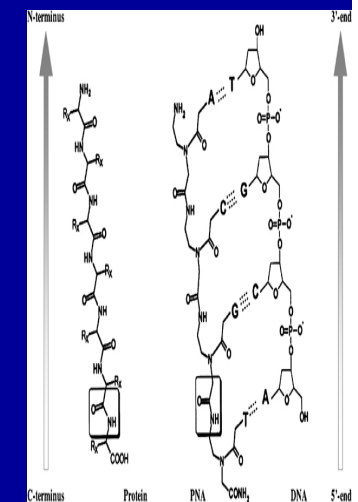
## PNA FISH: RAPID TESTING

The PNA FISH system provides rapid identification of positive blood cultures. Once a blood culture turns positive, a Gram stain is performed and the appropriate PNA FISH test is selected. The test can be performed in about 2.5 hours.

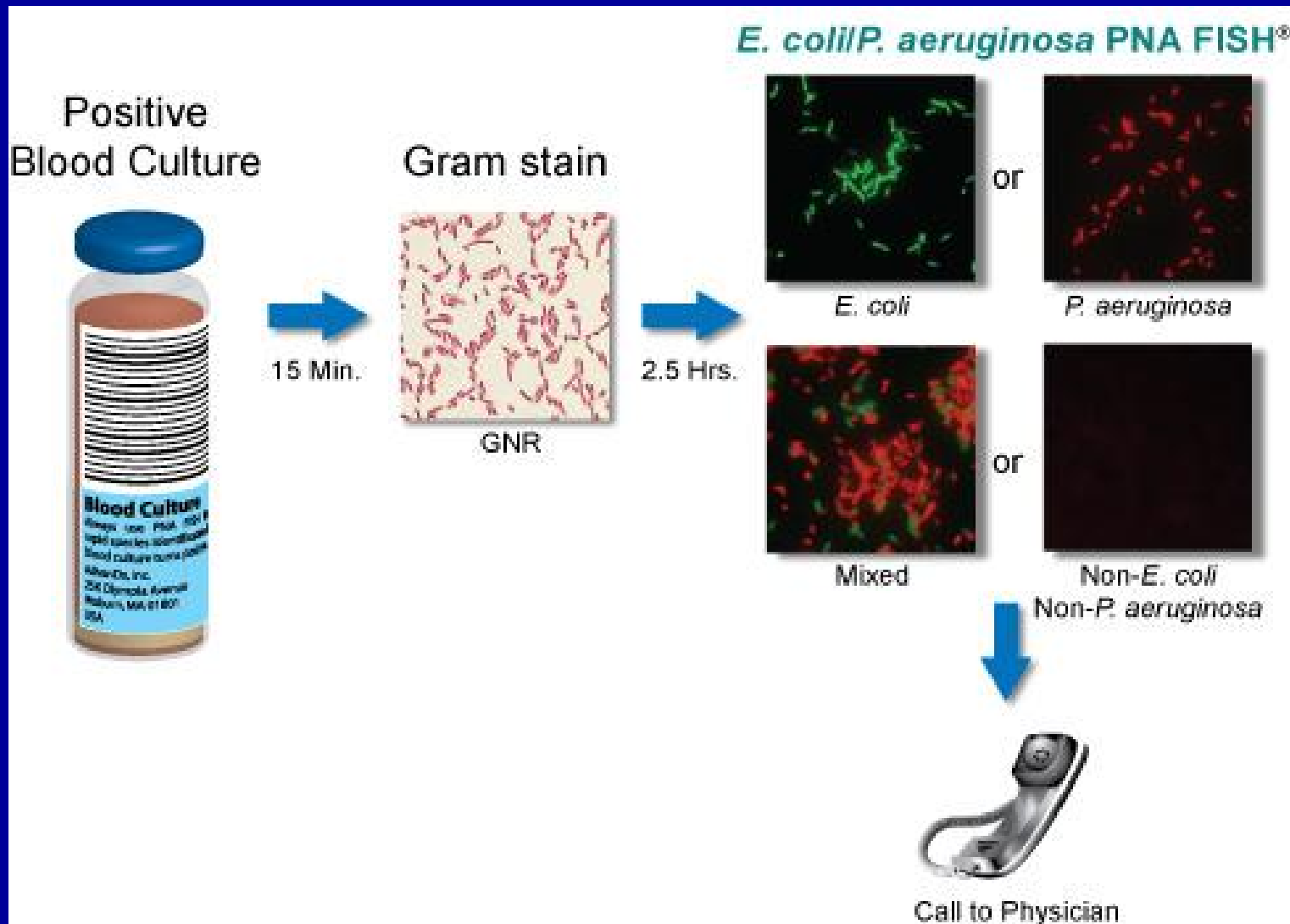
## *S. aureus* PNA Fish



- Peptit nükleik asitler, floresan *reporter* moleküllerle birleştirildiklerinde hızlı, özgül ve güçlü affinite gösteren hibridizasyon kinetiklerine sahiptirler
- PNA proplar DNA proplarının taklitleridir, nötral bir omurgaya sahiptirler, bu nedenle de biyostabildirler.
- PNA'nın DNA'ya göre göreceli hidrofobik özelliği, standart yayma preparatlarında hidrofobik hücre duvarını penetre etme yeteneği kazandırır
- Hedef genellikle **rRNA**'dır



# *E. coli*/*P. aeruginosa* PNA FISH



# 7-Epidemiyolojik tiplendirme

Epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yöneliktir

## Tiplendirme yeteneği

- Yinelenebilme yeteneği
- Ayırt etme gücü
- Uygulanma kolaylığı
- Geniş mikroorganizma grubunda kullanılabilir
- Yorumlanabilirliđi
- Maliyeti (zaman ve para olarak)

# Fenotipik Tiplendirme Yöntemleri

- Biyotiplendirme
- Serotiplendirme
- Bakteriyosin tiplendirmesi
- Faj Tiplendirmesi
- Antibiyotik duyarlılık testleri
- İmmunblot profil analizi
- Poliakrilamid jel elektroforezi ile yapısal proteinlerin belirlenmesi (PAGE)
- Multilokus enzim analizi

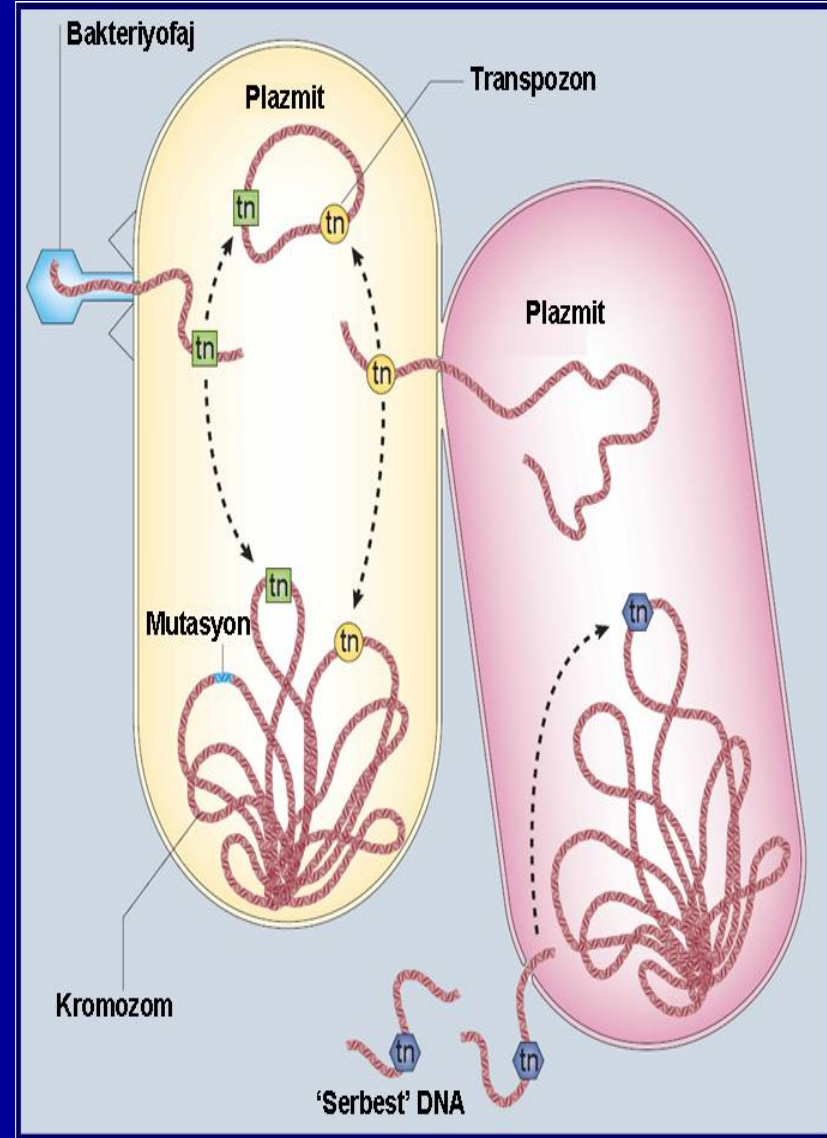
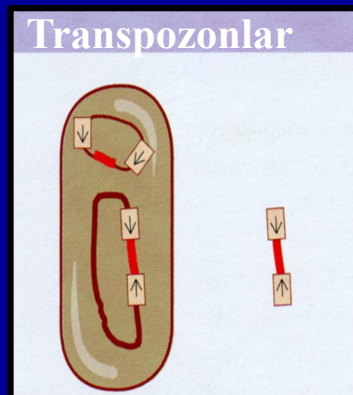
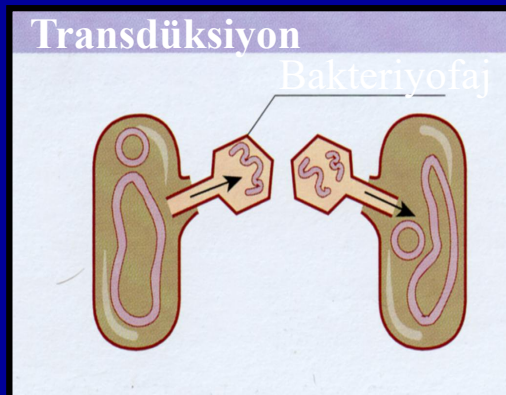
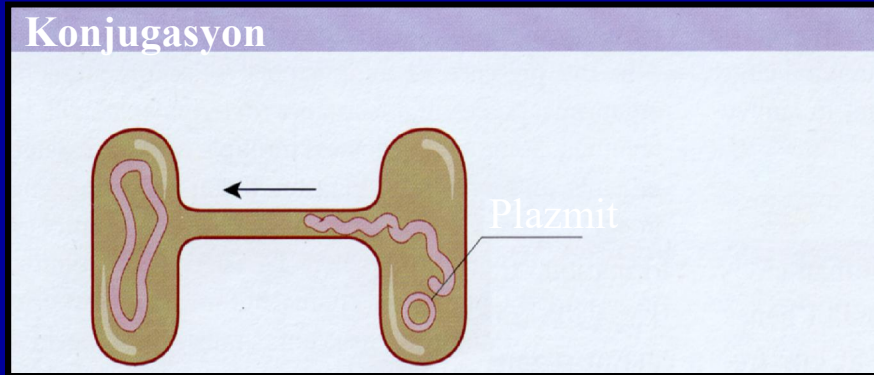
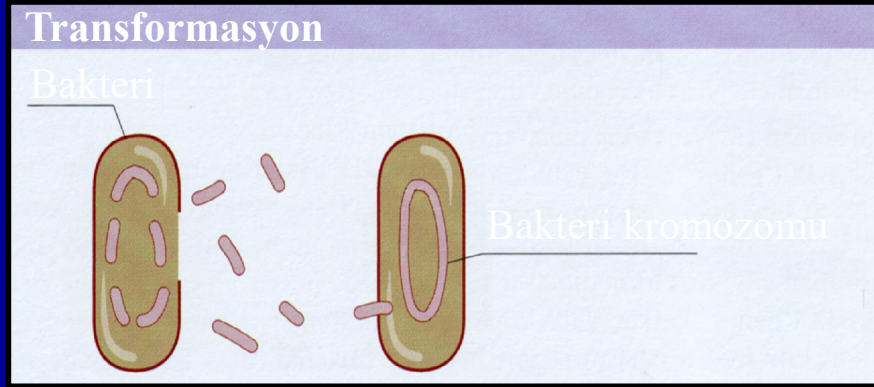
# Genotipik Tiplendirme Yöntemleri

- Hibridizasyona dayalı yöntemler (ribotipleme)
- Plazmit profil analizi
- *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)
- PCR'ye dayalı tiplendirme yöntemleri (RAPD)
- Restriksiyon endonükleaz analizi
- Nükleotit sekansa dayalı tiplendirme yöntemleri

# RİBO TİPLENDİRME (RIBOTYPING)

- •Agaroz jel elektroforezinde ayrılmış DNA fragmanları nitrosellüloz bir membran üzerine aktarılır (*blotted*)
- İşaretli, homolog DNA parçaları ile hibridizasyon uygulanarak (*Southern blotting*) hedeflenen genetik elemanlar aranır.
- Sıklıkla rRNA hedef alınır (*Ribotyping*)
- Ayırt edici gücü PFGE ve PCR kökenli yöntemlerden düşüktür

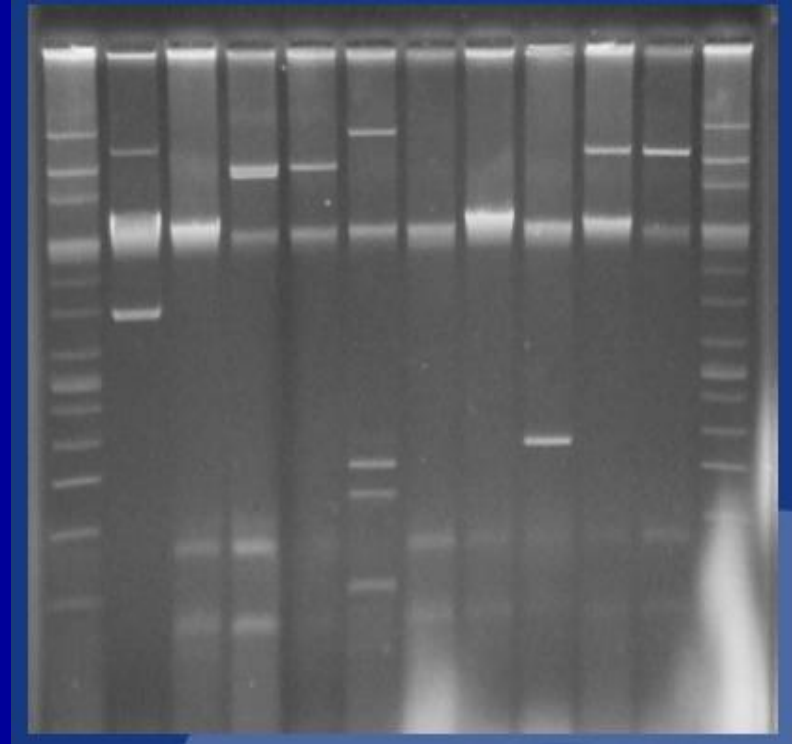
# Bakteriler arasında DNA transteri mekanizmaları



(Levy SB, Marshall B: 2004)

# Plazmid analizi ve Plazmid Restriksiyon analizi

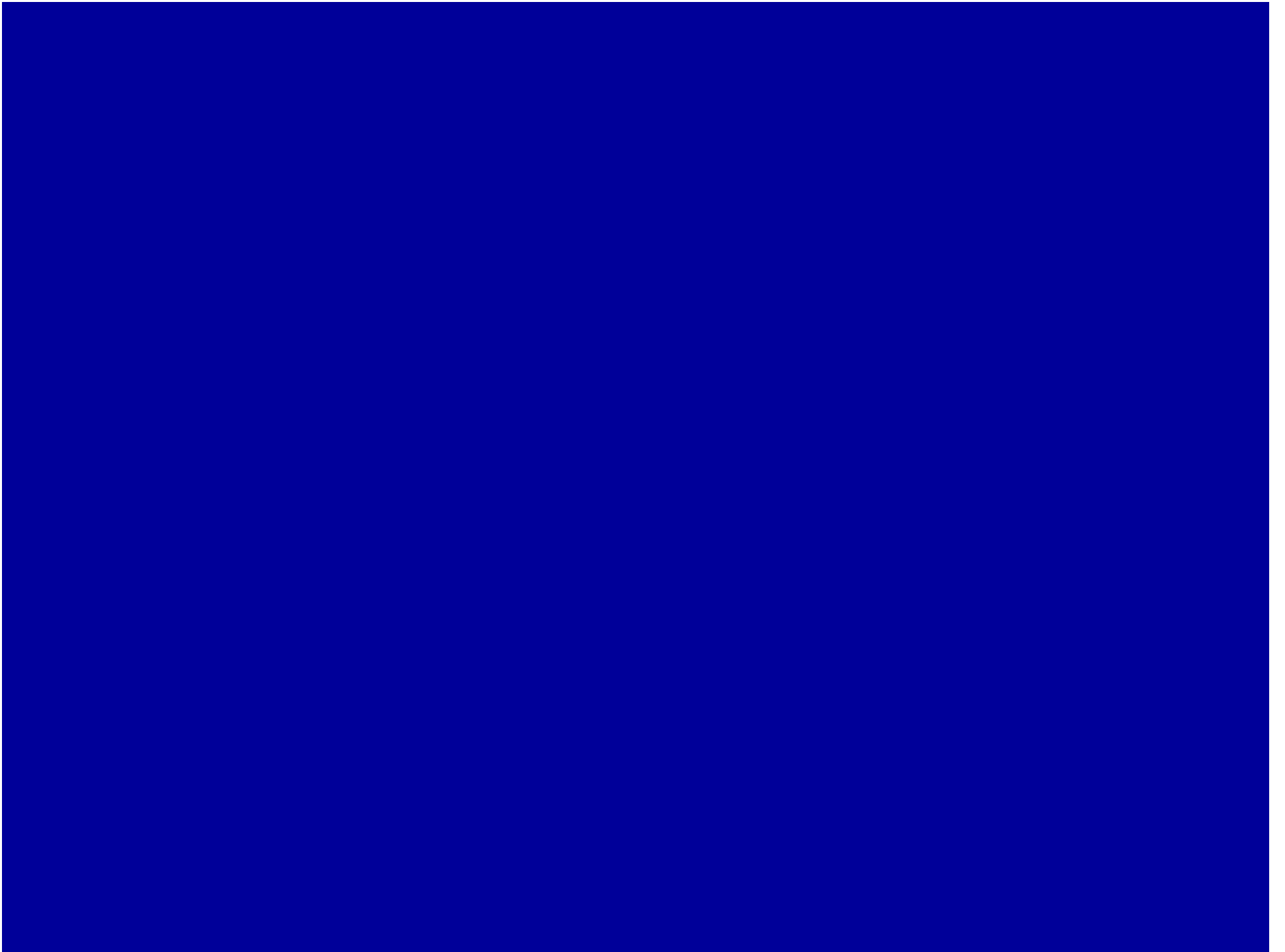
- En eski moleküler tiplendirme yöntemidir
- Tüm bakterilerde bulunmayabilir.
- Plazmidler alınıp kaybedilebilir: stabilite düşük
- Çabuk uygulanabilir.
- Öz. Salmonella tiplendirilmesinde yararı



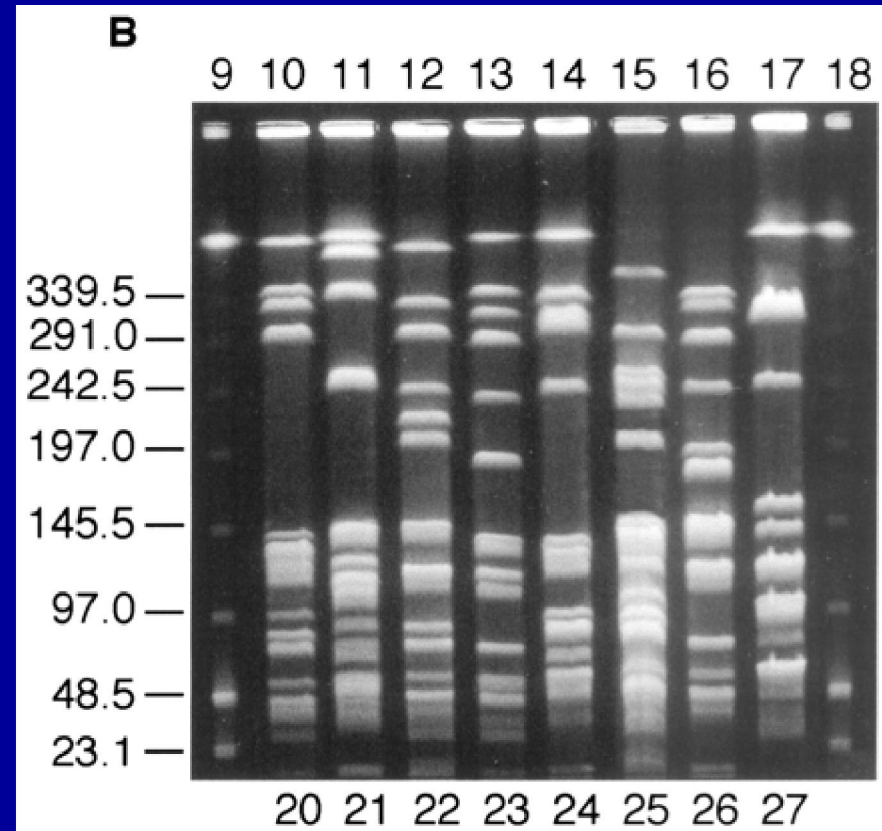
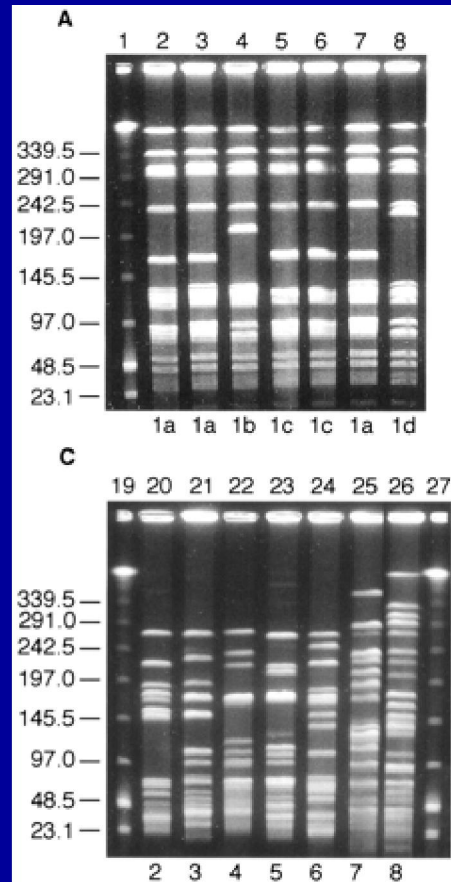


# Değişimli alan elektroforezi (Pulsed field gel electrophoresis; PFGE)

- Kısa süreli ilişkileri (örneğin hastane salgınları) incelemek için "altın standart"
- Farklı türler, ökaryotik mikroorganizmalarda kullanılabilir
- DNA agaroz içerisinde ekstrakte edilir ve kesilir.
- DNA'ye seyrek aralıklarla kesen bir enzim kullanılır. (10-800 kb; 10-25 parça)
- Özel elektroforez cihazı sayesinde büyük DNA parçaları ayrılır.

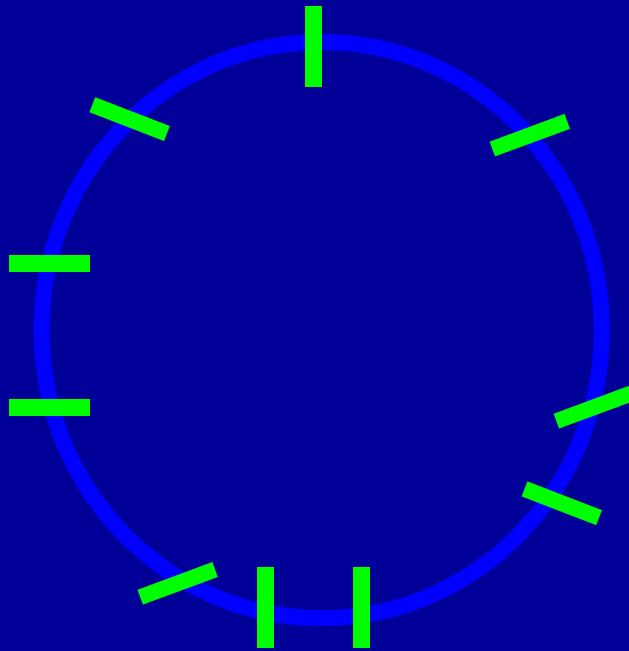


# PFGE



Lokal epidemiyolojik çalışmalarda

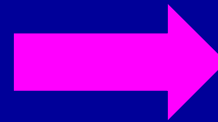
# PFGE



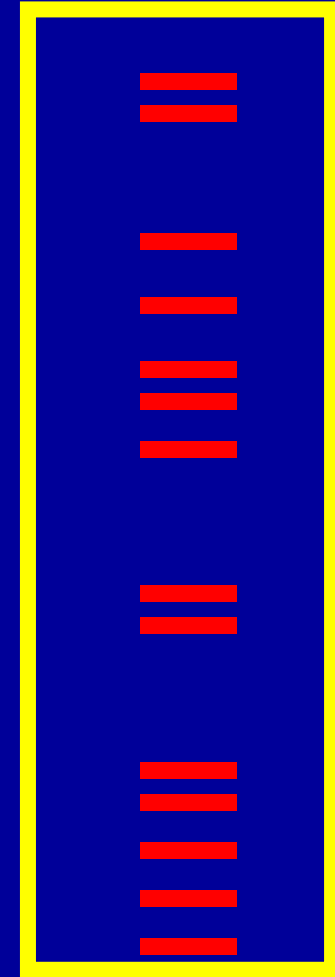
**Bakteri kromozomu**

**Nadir restriksiyon bölgeleri**

**Enzimle kesilir**



**Elektroforez**



**DNA Makrorestriksiyon  
Paterni**

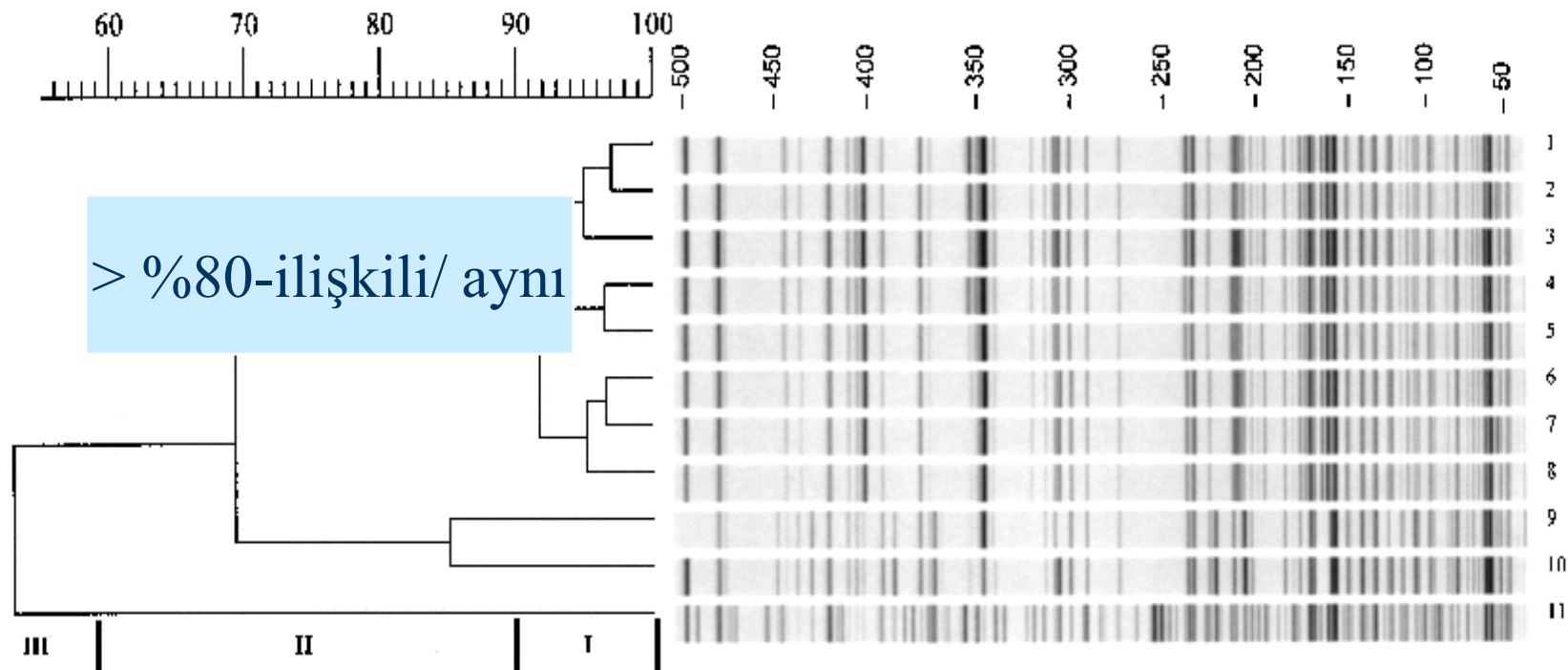


FIG. 2. Example of fluorescently labeled AFLP patterns and dendrogram for 11 different *Klebsiella* isolates. Patterns are the result of amplification of templates generated after restriction and ligation as shown in Fig. 1. The fragments were analyzed on an automated Vistra sequencer (Amersham-Pharmacia Biotech). The dendrogram was constructed with GelCompar (Applied Maths) software by using the Pearson correlation and cluster analysis by the unweighted pair group method using arithmetic averages. Percentages of similarity and molecular sizes (in base pairs) are shown above the dendrogram. Lanes 1 to 8, identical *Klebsiella pneumoniae* isolates; lanes 9 and 10, different *K. pneumoniae* strains; lane 11, a *Klebsiella oxytoca* strain. Within the AFLP patterns from *Klebsiella*, for instance, three windows of similarity may be applicable on the basis of the described experimental conditions: window I, 90 to 100% homology, identical strains; window II, 60 to 90% homology, different strains, same species (e.g., *Klebsiella pneumoniae*); window III, 40 to 60% homology, different species of the same genus; window IV, less than 40% homology, species from different genera.

# PFGE paternlerinin yorumu

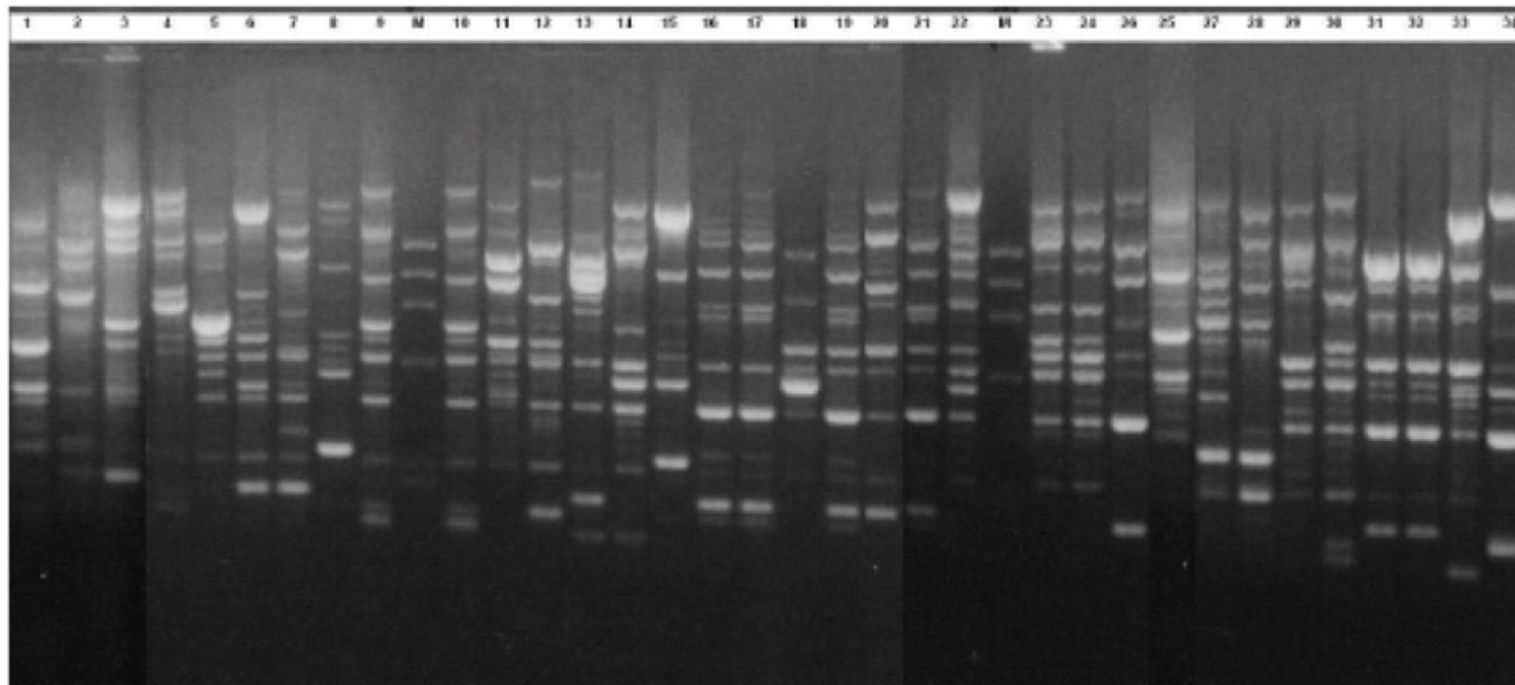
Bant farkı (sayı)	Genetik farklılık sayısı	Genetik ilişki	Epidemiyolojik Yorum
Yok	0	Aynı suş	Salgının parçası
1-3	1	Yakın ilişkili	Büyük olasılıkla salgının parçası
4-6	2	Olasılıkla ilişkili	Salgına ait olabilir
<u>≥7</u>	3 veya fazla	Farklı klon	Salgına ait değil

## **RASTGELE ÇOĐALTILMIŐ POLİMORFİK DNA (RAPD)**

- RAPD nükleotid dizilimi rasgele seçilmiŐ primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizimin belirlenmesini sağlar.
- Polimorfizimin belirlenmesi genetik iŐaretlerin (marker) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılır. RAPD' nin temeli yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rasgele seçilmiŐ tek çeşit primerlerin kullanıma dayanır.

# RAPD-PCR (*K.pneumoniae*)

Figure 1. RAPD profiles of *K.pneumoniae* isolates ( $n = 34$ ).



Lane M: OX174 DNA *Hae*III size marker.



# Kromozomal DNA'nın Restriksiyon analizi

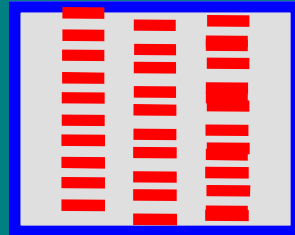
Kromozomal DNA



Sık kesen enzim Nadir kesen

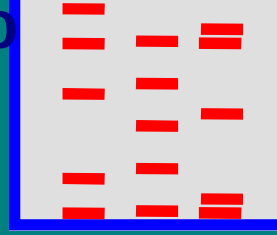
Büyüklik(kb)

Klasik Elektroz



30 1000  
0.1 10

Pulsed Field Elektroz



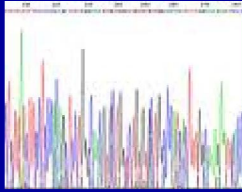
Transfer  
Rrn özgül prob  
'Reporter' sistemi



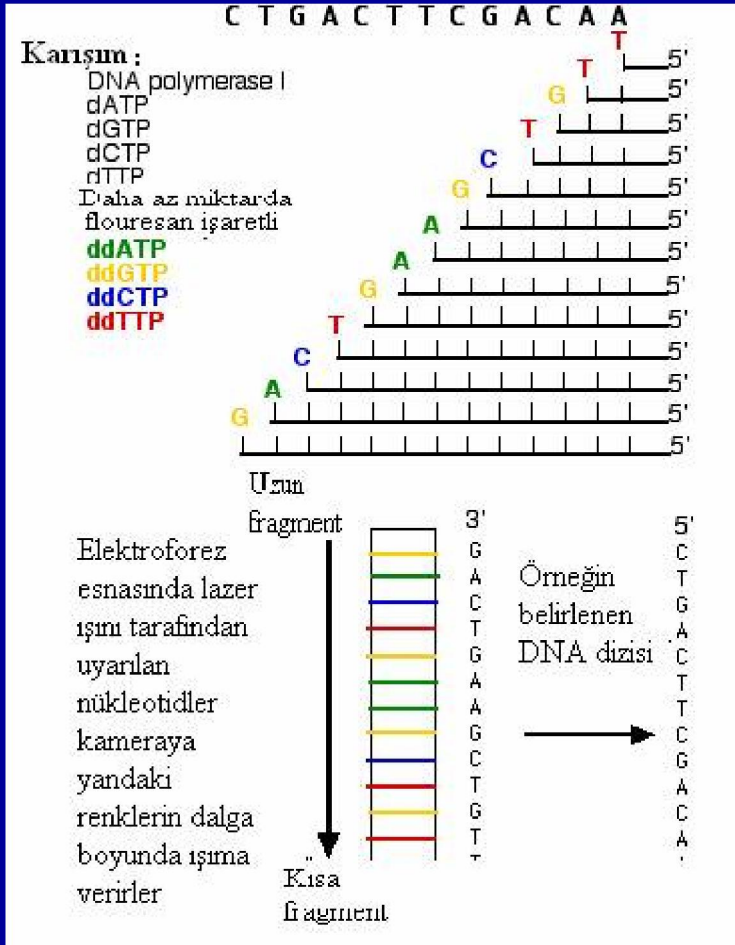
Southern Blot

# NÜKLEOTİT SEKANSINA DAYALI ANALİZLER

- DNA örneğindeki nükleotidlerin tam dizisinin belirlendiği bir yöntemdir.
- Bu amaç için günümüzde uygulanan yöntem **dideoxy metodudur**.
- DNA, dört çeşit deoksinükleotid trifosfatla sentezlenir. Her bir nükleotid 3' -OH ucundan bir sonraki nükleotide bağlanır.
- Dideoksi metoduyla sentetik oligonükleotid sentezinde 3' -OH molekülü kritik rol oynar.
- Sentez sırasında zincire bir dideoksinükleotid eklenmesi zincir uzamasını sonlandırır. Çünkü 3. karbon atomundaki 3' -OH molekülünün oksijen atomu bulundurmaması zincirin uzamasına izin vermez.
- Bu nedenle metod aynı zamanda zincir sonlandırma (**chain termination method**) olarak da adlandırılır.



# DNA Dizi analizi



- Reaksiyon sonrasında elektrokinetik enjeksiyon sistemiyle çalışan cihazlarda fragmentler, kısıdan uzuna doğru ayrılırlar. Bu ayrım kapiller denilen ince borucukların içerisinde o kadar hassas yapılıdır ki, birer nükleotid uzunluk farkıyla birbirlerini izlerler. Sonlandırıldıkları noktada dideoxynükleotid taşıdıkları için her bir fragment dört çeşit dideoxynükleotidten birine ait flouresan boyada bulundurmaktadır.
- Kapillerde bulunan küçük cam pencerenin önünden geçerken cihazın lazer sistemi flouresan boyaları uyararak her birinin kendine özgü dalga boyunda ışın yapmasını sağlar. Yine cihaza entegre bir kamera sistemiyle bu ışınlar kaydedilir, sıraya konup değişik bilgisayar değerlendirmeleri ve filtrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra DNA dizi bilgisi (sequence) olarak bize ulaşır.

# NÜKLEOTİT SEKANSINA DAYALI ANALİZLER

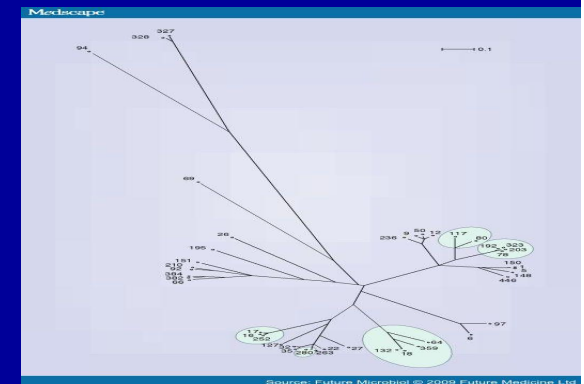
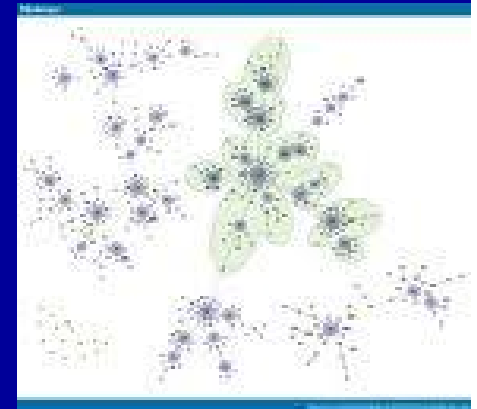
- **SLST** (*single-locus sequence typing*):  
Aynı tür içindeki farklı suşlardaki özgül bir gen lokusu (virulans, patojenite ya da direnç geni vb) tek nükleotit polimorfizmlerine sahiptir
- **MLST** (*multi-locus sequence typing*):  
SLST'ye göre genomun daha büyük bir bölümünü temsil eder ve genomu temsil yeteneği daha büyüktür

## *E. faecalis*

1. Glucose-6-phosphate dehydrogenase
2. Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
3. Phosphate ATP binding cassette transporter
4. Glucokinase
5. Shikimate-5-dehydrogenase
6. Xanthine phosphoribosyltransferase
7. Acetyl-CoA acetyltransferase

## *E. faecium*

1. adk1
2. atpA
3. ddl
4. gyd
5. gdh
6. purK
7. pstS



eBURST

www.mlst.net

Homan WL, JCM 2002;40(6):1963-71

Genetics 2007;175, 1251-1266

BMC Bioinformatics 2009;10, 152

# Sık görülen nozokomiyal patojenler için uygunluğu kanıtlanmış yöntemler

## Bakteri

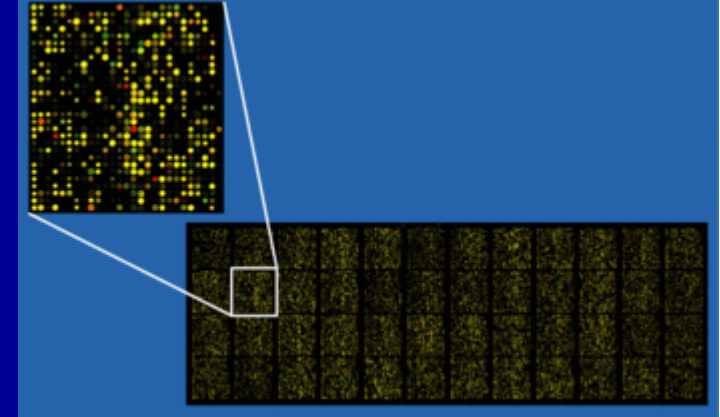
- *Staphylococcus aureus*
- *Enterococci*
- *Clostridium difficile*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella, Enterobacter*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Legionella*

## Yöntemler

- PFGE, rep-PCR, binary probe
- PFGE, AFLP
- PCR-ribotyping, rep-PCR
- PFGE, RAPD, AFLP
- PFGE, rep-PCR, AFLP
- Serotype, PFGE, RAPD, AFLP
- PFGE, AFLP, RAPD

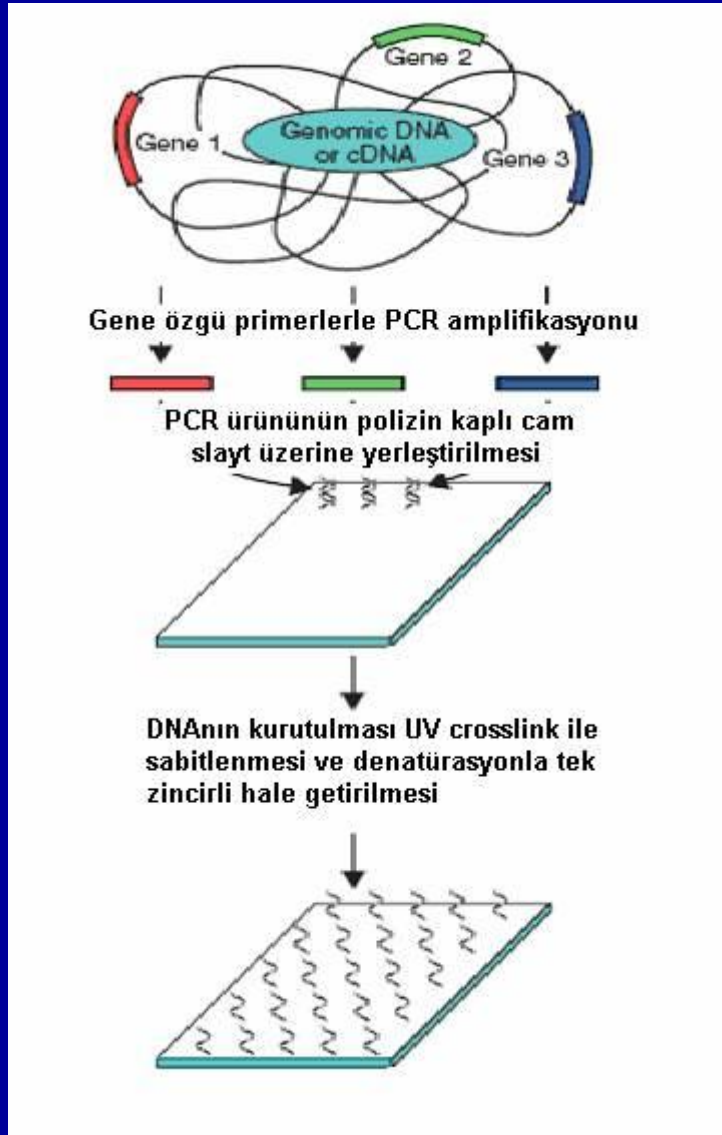


# DNA Chip teknolojisi



- Yüzlerce veya binlerce oligonükleotidin sert bir zemine bağlanması ile matriks hibridizasyon sistemi geliştirilmiştir.
- DNA Mikroçip (DNA Microarray) 'DNA çip', 'gen çip', 'genom çip', veya gen-dizi
- Genellikle herbiri bir geni temsil eden, ayrı ayrı küçük katı yüzeye kovalent bağlarla sabitlenmiş binlerce DNA parçacıkları topluluğudur.
- Nicel veya nitel ölçümler zorlayıcı şartlar altında seçici DNA-DNA veya DNA-RNA etkileşimi ve florofor tabanlı algılama esaslarına dayanmaktadır.
- DNA mikroçip teknolojisi çoğunlukla gen ifadesi profilini çıkarmada, yani aynı anda çok sayıda genin ifade ( expression) düzeyinin gözlemlenmesinde veya karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışmalarında kullanılmaktadır.

DNA Mikroarray çip yapımı. PCR ürünleri; geni veya genin bir bölümünü temsil eder. Cam slayt üzerine yerleştirilip sabitlenirler. Sonuçta tek zincirli DNA fragmentleri, komplementleri ( karşı zincirleri) ile bağlanabilir ve işaretlenebilirler.

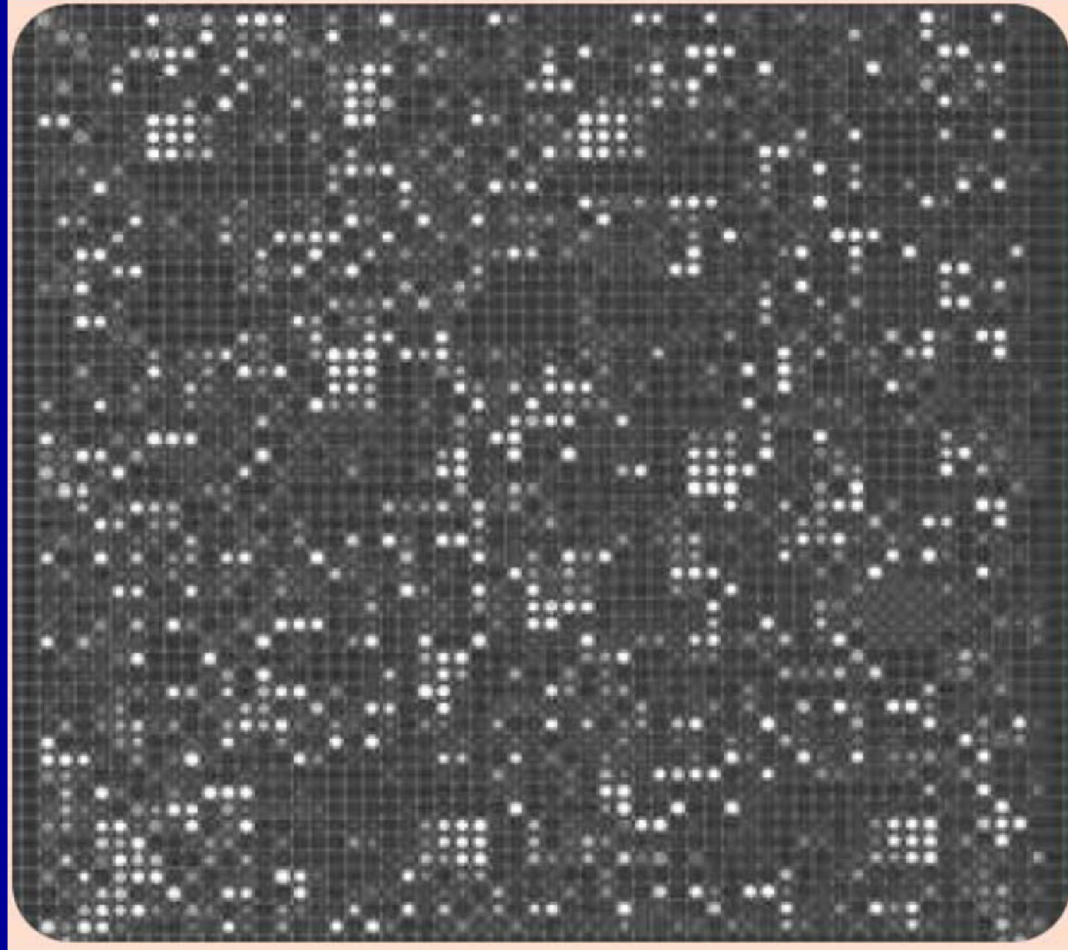


- Mikrodizin cihazı ile; yaklaşık 1.8\*1.8 cm ebatlarındaki bir cam üzerinde (dizi veya array ) neredeyse tüm bir genomu tek bir seferde yüksek hassasiyette inceleme olanağı mevcuttur.
- Başka bir deyişle aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisi hakkında görsel ve matematiksel sonuçlar elde etmek mümkündür.

- İki temel uygulama alanından
- Yeni gen dizilerinin belirlenmesi,
  - Genlerin mRNA düzeyinde ifadelerinin saptanması ve karşılaştırılmasıdır.

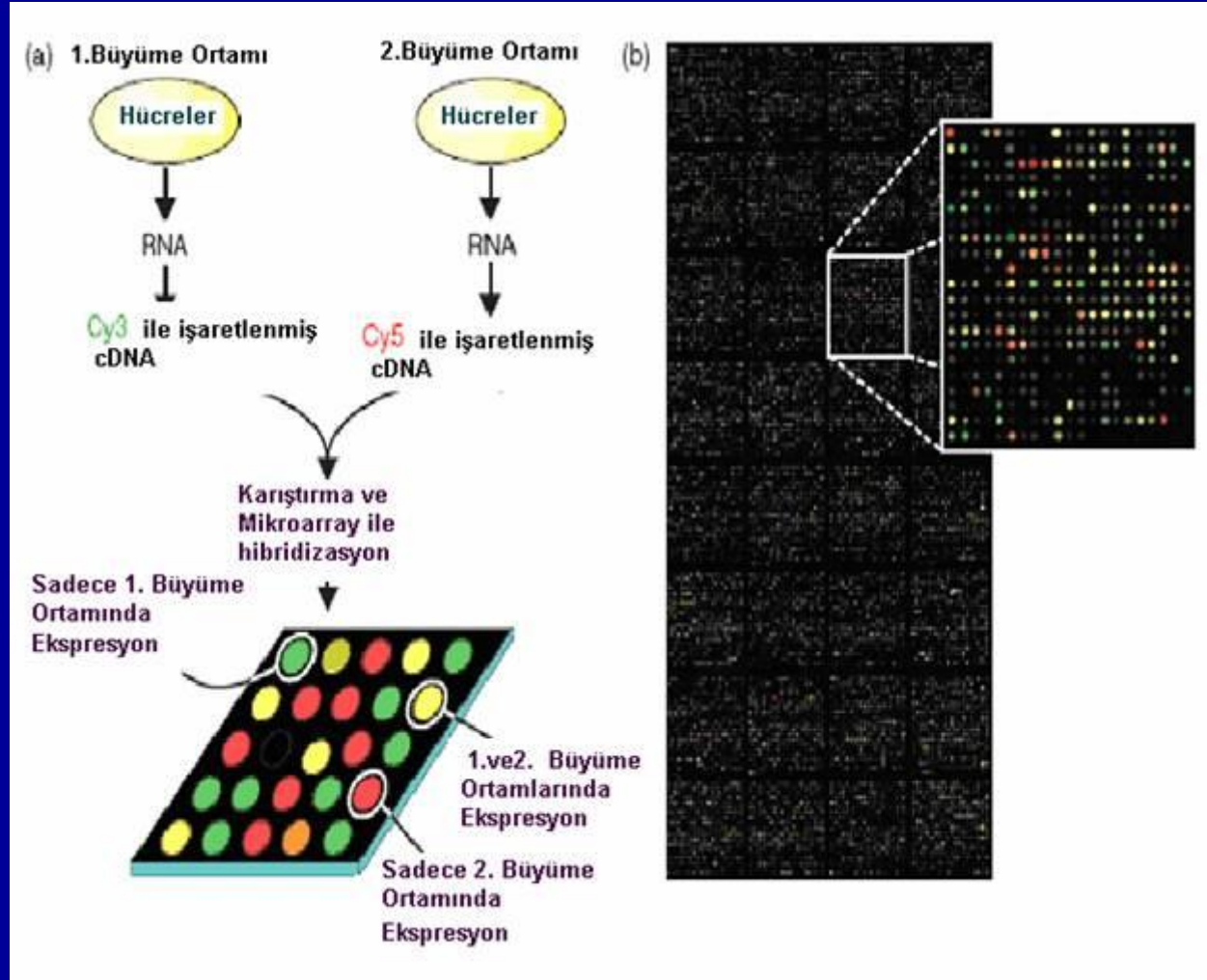


**Hibridizasyon ve post-hibridizasyon süreçleri sonrasında  
mukrofluidik çipi gösteren floresan tarama görüntüsü**



*Teşekkürler....*

# DNA Chip teknolojisi



- Gen ekspresyonları arasındaki farkın, iki RNA örneği kullanılarak mikroarrayde belirlenmesi: (a) 1 nolu ortamda çoğalan hücrelerden izole edilen RNA, oligo-dT primerler kullanılarak cDNA ya dönüştürülmüş ve yeşil floresan boya ile işaretlenmiştir (Cy3). Benzer şekilde; 2 nolu ortamda çoğalan hücrelerden izole edilen RNA, oligo-dT primerler kullanılarak cDNA ya dönüştürülmüş ve kırmızı floresan boya ile işaretlenmiştir (Cy5). cDNA örnekleri eşit oranlarda karıştırılarak mikroarray ile hibridize edilmiştir. Mikroarrayin floresan mikroskop görüntüsü renkli noktacıklardan oluşur. Yeşil renkli noktacık ilgili genin sadece 1 nolu büyüme ortamında ekspresyonunun olduğunu; kırmızı renkli noktacık ise genin sadece 2 nolu büyüme ortamında ekspresyonunun olduğunu gösterir. 1 ve 2 nolu ortamlardan eşit miktarda cDNA , mikroarrayin tek zincir DNA sına bağlanırsa eşit miktarlardaki kırmızı ve yeşilin karışımını ifade eden sarı renkli ışınım ortaya çıkar. (b) Fare gen dizilerinden türetilmiş gen ekspresyonlarını ifade eden farklı RNA örneklerinin bir mikroarray görüntüsü

- Örneğin; Şekil-2'de görüldüğü gibi eğer 1 nolu ortamdaki hücrelerde bir genin ekspresyonu yapılıyor, 2 nolu ortamda yapılmıyorsa karıştırılan cDNA'da sadece Cy3 işaretli cDNA'nın tamamlayıcısı olan, mikroarrayde yeşil ışınım yapan noktacıktaki cDNA ile hibridize olacaktır.

Benzer şekilde, bir gen sadece 2 nolu ortamda ifade ediliyorsa mikroarrayde kırmızı renkte ışınım yapacaktır. Genler her iki ortamda da eşit şekilde ifade ediliyorsa ışınım, renklerin karışımı olan sarı renkte olacaktır.

Mikroarrayin, her bir örneğin mRNA düzeylerine göre kesin kalibrasyonu önemlidir. Yeşil ve kırmızı floresan sinyaller arasındaki oran, genomik DNA içeren değişik noktacıklarda (spot) hesaplanmalıdır. Floresan dedektörü, bileşenlerin ölçülen bağıl yoğunluk yüzdesi 1.0 olacak şekilde kalibre edilebilir. Yeşil ve kırmızı sinyallerin relatif yoğunluğu, her bir örnekteki spesifik mRNA 'nın relatif yoğunluğu ile kıyaslanarak hesaplanır. Bu durum gelecekte, DNA mikroarrayla tüm genomu kapsayacak şekilde gen ekspresyonunu analiz edebileceğimiz (**Transkript Profili**) anlamına gelmektedir.

- Hastalığa yatkınlığın önceden belirlenmesi
  - Kişiyeye özel ilaç tasarımlarının yapılabilmesi.
  - Gen tedavisi ve gene özgü ilaç üretimi
  - Yeni enerji kaynaklarının bulunması
  - Adli tıp çalışmalarında kullanılması
  - Genetik testlerde kullanılması
  - Tarımda sağlıklı ve çok daha verimli çiftlik hayvanlarının geliştirilmesi
  - Besin değeri yüksek ürünler geliştirilmesi
  - Islah çalışmalarında zaman kazanılması vb. birçok uygulama alanı vardır.