

## ***Proteus mirabilis*'in moleküler tipleme için pulsed-field jel elektroforezinin optimizasyonu**

### ***Optimization of a pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Proteus mirabilis****

Alper Karagöz<sup>1</sup>, Mehmet Reşat Ceylan<sup>2</sup>, Rıza Durmaz<sup>1</sup>

#### **ÖZET**

**Amaç:** *Proteus mirabilis* ile oluşan salgınlara saptanması için suşlar arasında klonal ilişkinin belirlenmesine yönelik "pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)" gibi yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu çalışmanın amacı; *Proteus mirabilis*'in moleküler tipleme için pulsed-field jel elektroforezinin optimizasyonudur.

**Yöntemler:** Bu çalışmada; *Proteus mirabilis* tiplemesinde kullanılmak üzere optimize edilmiş bir pulsed-field jel elektroforezi protokolü sunulmuştur. Suşların filogenetik analizleri Bionumerics yazılım sistemi (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium) ile değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Gram-negatif bakteriler için kullanılan PFGE protokollerinden farklı olarak NotI enziminin bu bakteri için uygun olduğu belirlendi ve elektroforez koşulları: - blok 1 için başlangıç vuruş süresi 1 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 8 saat; - blok 2 için başlangıç vuruş süresi 30 sn, bitiş vuruş süresi 70 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 16 saat; - TBE pH=8.4 olarak saptandı.

**Sonuç:** Bu PFGE protokolünün; *P. mirabilis* suşlarının tiplendirilmesi ve Bionumerics yazılım sistemi ile klonal ilişkilerinin belirlenmesi için uygun olduğu anlaşıldı. Optimize edilen yöntem basit, tekrarlanabilir ve bu bakteri için kullanıma uygundur. Ayrıca süreyi kısaltması, kullanılan çözelti ve enzimlerin düşük hacimleriyle çalışabilmesi nedeniyle, ekonomik olarak değerlendirilmiştir. Çalışılan bakterilere bağlı salgınlara değerlendirme ve hastane enfeksiyonlarının yaygınlık derecesi hakkında yararlı bilgiler sunma potansiyeli vardır. Optimize edilen bu protokol, farklı merkezlere ait PFGE sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılmasına da olanak sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Proteus mirabilis*, moleküler tipleme, pulsed-field jel elektroforezi.

#### **ABSTRACT**

**Objective:** For the detection of outbreaks caused by *Proteus mirabilis*, strains clonal relations are determined methods as "pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)". The aim of this study was optimization of a pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *P. mirabilis*.

**Methods:** In this study, PFGE' protocol is optimized for use in molecular typing of *P. mirabilis*. Phylogenetic analyzes of strains were evaluated with Bionumerics software system (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium).

**Results:** This protocol compared with Gram-negative bacteria PFGE protocols, NotI enzyme is suitable for this bacterium. Electrophoresis conditions should be revealed as; - block 1: initial pulse duration 1 sec, ending pulse duration 30 sec, striking angle 120°, the current 6 V/cm<sup>2</sup>, temperature 14°C, time 8 hours; - block 2: initial pulse duration 30 sec, ending pulse duration 70 sec, striking angle 120°, the current 6 V/cm<sup>2</sup>, temperature 14°C, time 16 hours; - TBE, pH=8.4.

**Conclusion:** *P. mirabilis* strains were typed by PFGE and Bionumerics analysis program were determined clonal relationships. The procedure was simple, reproducible and suitable for these bacteria. Also it was evaluated, because of reducing time, the solution volumes and enzymes can be economically. Outbreaks of nosocomial infections due to bacteria studied assessment and the potential to provide useful information about the degree of prevalence. This optimized protocol is allowed different centers' PFGE results to compare with other laboratories results. *J Clin Exp Invest* 2013; 4 (3): 306-312

**Key words:** *Proteus mirabilis*, molecular typing, pulsed-field gel electrophoresis.

<sup>1</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Van 100. Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Anabilim Dalı, Van, Türkiye

**Correspondence:** Mehmet Reşat Ceylan,

Van 100. Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon AD, Van, Türkiye Email: dr.mresatceylan@gmail.com

Received: 13.05.2013, Accepted: 17.06.2013

Copyright © JCEI / Journal of Clinical and Experimental Investigations 2013, All rights reserved

## GİRİŞ

*Proteus*'lar Gram-negatif, fakültatif anaerob, hareketli, pleomorfik ve kısa çubuk şeklinde bakterilerdir. *Proteus* türleri toprak, su, çürümekte olan maddelerin üzerinde, insan ve hayvan bağırsak sistemlerinde bulunur. Bu bakteriler yüksek proteolitik aktiviteye sahiptir. *Proteus*'lar arasında enfeksiyon etkeni olarak en sık karşımıza çıkan *Proteus mirabilis*'dir. *P. mirabilis* idrar yolu enfeksiyonlarının sık görülen bir etkenidir [1]. Genellikle üretranın dışkı ile kontamine olması ya da kateter uygulamaları sonucunda idrar yolu enfeksiyonuna neden olmaktadır. Akut veya kronik enfeksiyon yapabilir. Böbrekte taş oluşumuna neden olur. Bu taşlar idrar yollarında tıkanıklıklara, epitel hücrelerinde destrüksiyona ve enfeksiyonun süresinin uzamasına neden olur [1,2].

Günümüzde bakteriler ile oluşan salgınların saptanması, olası etken suşlar arasındaki klonal (genetik) ilişkinin veya farklılıkların belirlenmesine yönelik yöntemlere ihtiyaç vardır [1]. Moleküler tiplendirme yöntemleri kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koyarak, salgınların kaynak, bulaş yolları ve bulaşın derecesi hakkında oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır. Epidemiyolojik sürveyans ve olası bir salgınla ilişkili suşlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmada farklı moleküler tiplendirme yöntemleri denemektedir [11,13,16]. Bunlar arasında ayırım gücü en yüksek olan "pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)" yöntemidir [12,13,17]. Altın standart olarak kabul edilen bu yöntemin, en önemli dezavantajı, farklı laboratuvarlarda değişik protokollerin uygulanması nedeniyle sonuçların birbirleriyle kıyaslanma olanağının olmamasıdır. İkinci önemli sorun ise klasik PFGE protokollerinin 3-4 gün gibi uzun sürede sonuçlanmasıdır [6,8,9]. Araştırmacılar bu iki önemli sorunu gidermek üzere çaba harcamaktadırlar. Birçok bakteri türünün moleküler tiplendirmesinde kullanılacak, kısa sürede sonuçlanan ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilen sonuçlar alınabilecek PFGE protokolleri üzerinde çalışılmaktadır [22].

*P. mirabilis* suşlarının moleküler analizi ve suşlar arasındaki klonal (genetik) ilişkinin veya farklılıkların tespiti, uygulanan yöntemin değerlendirilmesi açısından son derece önemlidir. Bugüne kadar *P. mirabilis* için standardize bir PFGE yöntemi bulunamayışı nedeniyle laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılabilmesinde çeşitli güçlükler yaşanmaktadır. Ülkemiz için referans laboratuvar niteliğinde olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı bünyesindeki Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında, *P. mirabilis* suşları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesinde kullanılacak kısa

sürelili bir PFGE protokolü geliştirilmiştir [4,10,12]. Bu çalışmada protokolün ayrıntıları sunulmuştur.

## YÖNTEMLER

PFGE yöntemi agaroz içine gömülü haldeki bakteriden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzimi (RE) ile kesim profilinin belirlenmesi esasına dayanır [18,19,20]. Yöntemde başlıca şu aşamalar bulunmaktadır: çalışılacak bakterilerin hazırlanması, bakterilerin agarozla karıştırılması, agaroz içindeki bakterilerin parçalanması (in situ lysis), agaroz içindeki kromozomun saflaştırılması, agaroz içindeki kromozomal DNA'nın RE ile kesilmesi (in situ-digestion), elektroforezle DNA parçalarının ayrıştırılması, DNA bantlarının görünür hale getirilmesi ve sonuçların yorumlanması [8,14,21].

### A. İzolatların hazırlanması [3,4]

1. Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanmış bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapılır.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilir.
3. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakılır.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyonu tamponu (HST; 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH=8.0) içinde süspansiyon edilir.
5. Hücre süspansiyonu, 2500 devirde, 4°C'de, 15 dakika (alternatif olarak 13000 devirde 4°C'de, 2 dakika) santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır. Tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır.

Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UVNis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlanır. Bakteri süspansiyonu kısa süre (5 dakika) içinde agaroz gömülecek ise oda ısısında, gömülmeyecek ise kırık buz içinde bekletilir.

### B. İzolatların agaroz gömülmesi [3,4]

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlanır. Bu amaçla 0.200 g agaroz, 100 ml'lik balona konur. Üzerine 9 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak ha-

fifçe karıştırılır. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırında tutulur. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konur. %10'luk sodyum dodesil sülfattan (SDS, 50°C'de ısıtılmış) 1 ml eklenerek iyice karıştırılır. Agaroz-SDS karışımından 200 µl Ependorf tüplere dağıtılır ve 45-50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletilir.

2. Agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtulur.

3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısıly agaroz-SDS bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır.

4. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Sio Rad Laboratories) 100 µl dağıtılır. Kalıplar, agaroz katılaşıncaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletilir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen karışması sağlanır.

### C. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması [4]

5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml Hücre Lizis Solüsyonu-1 (HLS-1; 50 mM Tris-HCl [pH=8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konulur. (Not: lizozim ve proteinaz K parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklenecektir)

6 mL HLS-1 hazırlamak için

Proteinaz K/10 mg/ml)	900 µl
Lizozim (100 mg/ml)	150 µl
10X TE (0.5 M Tris-HCL, pH=8.4; 0.5 M EDTA)	600 µl
Distile su	4350 µl

İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilir. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir (Not: tüp su banyosuna hafif yatık pozisyonda yerleştirilir). HLS-1 dökülerek, yerine 0.5 ml HLS-2 (0.5 M EDTA, %1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K) konulur. (Not: proteinaz K parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklenecektir)

6 mL HLS-2 hazırlamak için

Proteinaz K (10 mg/ml)	240 µl
10X SE (5 M EDTA, %10 sarkozil)	600 µl
Distile su	5160 µl

55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

### D. Hücre lizisinden sonra agaroz kalıplarının yıkanması [3,4]

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilir. Dikkatlice HLS-2 aspire edilir. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletilir (su ile yıkama işlemi). Su tamamen aspire edilir. Su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlanır. Su tamamen aspire edilir. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH=7.6) tamponuyla yıkanır (Not: yıkama sonrası agaroz kalıpları şeffaflaşır). Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, RE ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

### E. Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

*P. mirabilis* için etkinliği daha önce araştırılmış olan NotI (5-7) enzimi kullanılmıştır. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 µl 1x NotI tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletilir. (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklanır). Sonra sıvı aspire edilir. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10 µl 10x NotI tamponu,

3 µl NotI enzimi (10 U/µl) (Promega Corporation, WI, USA),

87 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type),

Toplam hacim 100 µl.

Bu karışımın içerisine enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir [5]. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

### F. Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi [3]

1. 0.5X TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH=8.0) içine 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlanır.

i. 1 g agaroz 200 ml'lik balona konulur.

ii. Üzerine 100 ml 0.5X TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.

iii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak ha-

fifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırında tutulur.

iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konulur.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş düz bir zemine konulur.

3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenarı ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklenir.

4. Kurutma kağıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir.

5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür.

6. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1'lik agarozla doldurulabilir.

Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900-2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

## G. Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad laboratories, Nazareth, Belgium) *P. mirabilis* için uygulanan elektroforez koşulları; - blok 1: başlangıç vuruş süresi 1 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 8 saat, - blok 2: başlangıç vuruş süresi 30 sn, bitiş vuruş süresi 70 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 16 saat; TBE tamponu, pH=8.4.

## H. Sonucun gözlenmesi ve analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyanır. UV ışığı altında görüntülenir. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü 1708x1280 piksel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kayıt edilir.

Bionumerics yazılım sistemi (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edilir. Öncelikle her resimde

bulunan üç adet standart (1., 7. ve 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapılır. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin, dendrogramı oluşturulur ve kümeleşme analizi yapılır. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenir. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1-1.5 olarak alınır.

Tenover ve ark. [15] tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirilir.

Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidirler.

Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.

Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.

İlişkisiz izolatlar: Aralarında ≥7 bant farkı olan suşlardır. Salgınla ilişkileri yoktur.

## I. Çalışma çözeltileri

1. 10X TE çözeltisi (HLS-1 hazırlamak için)

2 M Tris-HCl	50 ml
0.5 M EDTA, pH=8.0	20 ml
Distile su	930 ml

2. 1X SE çözeltisi (HLS-2 hazırlamak için)

0.5 M EDTA, %1 sarkozil

3. HST-1 (pH=8.0) çözeltisi

100 mM Tris-HCl

100 mM EDTA

4. 2 M Tris-HCl (pH=8.0) stok çözeltisi

Tris base (sigma) 10.6 g

Tris-HCl (sigma) 17.7 g

Mili Q ile 100 ml'ye tamamlanır.

5. Tris-EDTA (TE) buffer (pH=7.4-8.0) çözeltisi

1X TE için 10 ml 1 M Tris-HCl (veya 5 ml 2 M Tris-HCl)

2 ml 0.5 M EDTA (pH=8.0)

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

6. TE (Wash buffer) çözeltisi

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA (pH=7.4)

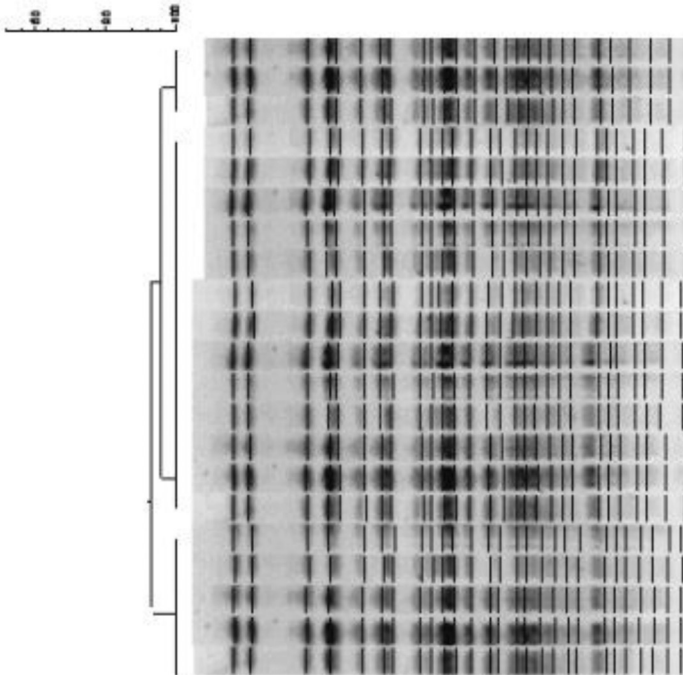


## BULGULAR

*Proteus mirabilis* izolatlarının genotipik tiplendirilmesi amacıyla yapılan PFGE çalışmasında *P. mirabilis* DNA'ları restriksiyon endonükleaz aktiviteli NotI enzimiyle kesildikten sonra çeşitli bant paternlerinin görüldüğü PFGE jel görüntüleri ortaya çıktı (Şekil 1).

*Proteus mirabilis* suşlarının PFGE yöntemi ile NotI makrorestriksiyon enzimleri ile kesimlerinin ardından, farklı molekül büyüklüklerine sahip bantlar

elde edilmiştir. "Dice" benzerlik katsayısı ve UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan PFGE modellerinin dendogramları sırasıyla Şekil 1'de gösterilmiştir. NotI enzimi ile kesilen *P. mirabilis* suşları birbirleri ile klonal yönden ilişkili bulunmuştur. PFGE modeli genetik benzerliklerini % 98 olarak göstermiştir. Yapılan optimizasyon çalışmasında kullanılan bütün suşlar (%100) PFGE yöntemiyle tiplendirilmiş ve bu moleküler tekniğin *P. mirabilis* suşlarının genetik profilinin belirlenmesi için uygun olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 1. *Proteus mirabilis* suşlarına ait dendogram ve PFGE görüntüsü

## TARTIŞMA

Çalışmamızda PFGE-CHEF sistemi kullanılarak yapılan *Proteus mirabilis* suşlarının analizinde Tenover ve ark.'nın standart kriterleri esas alınmıştır. Tenover kriterlerine göre izolatların restriksiyon paternleri aynı bant sayısına sahipse ve karşılıklı bantlar aynı boyuttaysa bu izolatlar aynı suştur. Bizim çalışmamızdaki 21 suş içerisinde küme oluşturan 21 suş aynı bant profiline sahip olup epidemiyolojik olarak aynı suş olabilirler, bu suşların epidemiyolojik olarak incelendiğinde aynı bölgeden başvuru yaptıkları tespit edilmiştir, bununla birlikte direnç profilleri karşılaştırıldığında bir benzerliğe rastlanmamıştır. NotI kesim profillerine göre çalışmamızdaki 21 suşun birbirleriyle epidemiyolojik olarak ilişkili olduğunu söylemek mümkündür.

*Proteus mirabilis* suşlarının genetik profili hakkında daha ayrıntılı bilgi elde etmek adına gün-

müzde yapılan moleküler çalışmalardan biri de PFGE'dir. Bu çalışmada *Proteus mirabilis* suşlarını genotipik olarak PFGE yöntemiyle inceleyerek, suşların klonal ilişkisi hakkında bilgi edinmek amaçlandı.

Günümüzde etkenin belli bölgelerde endemik olması nedeniyle, epidemiyolojik sürveyans için duyarlı ve standart yöntemler gereklidir. Moleküler tiplendirme, *Proteus* sürveyansının duyarlılık ve özgüllüğünü büyük ölçüde artırmakta ve geleneksel sürveyans yöntemleriyle saptanamayacak salgınları belirleme ve halk sağlığı için önemli özel klonları hızla tanımlama olanağı sağlamaktadır. PPA (plasmid profile analysis), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), IS200 RFLP (restriction fragment length polymorphism), ribotiplendirme ve PFGE muhtemel genetik ilişkileri belirleme ve tanımlamada kullanılan yöntemlerdir. PFGE, ilk tarif edildiği 1983 yılından sonra birçok bakteri için kullanılan moleküler epidemiyolojik yöntemler içinde,

suşlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymada güvenilir standart bir yöntem haline gelmiştir. PFGE, günümüzde *Proteus* serotipleri için de standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu teknikte, megabaz büyüklüğündeki kromozom DNA'sı, seyrek olarak, aralıklı kesen makrorestriksiyon enzimleriyle kesilmekte; kesilen büyük DNA parçaları, farklı yönlerden elektrik akımı uygulayabilen elektroforez aygıtı ile jel üzerinde yürütüldükten sonra görüntülenebilmektedir. PFGE, ABD'de ve çeşitli Avrupa ülkelerinde *Proteus* salgın araştırmalarında elde edilen bulguları karşılaştırabilmek amacıyla standart protokolle uygulanmaktadır. PFGE'nin NotI ile kullanımı, *Proteus* serotipleri için yaygın olarak kabul görmektedir.

Sunulan bu çalışma, NotI enzimi ile uygulanan PFGE'nin, PPA ile birlikte değerlendirildiğinde, benzer direnç fenotipine sahip izolatların ayırt edilmesinde ve farklı direnç modellerine sahip izolatlar arasındaki genetik ilişkiyi saptamada yararlı olduğunu; bu enzimle elde edilen modellerin birlikte değerlendirilmesiyle, PFGE yönteminin *Proteus* için ayırt ediciliğinin arttığını göstermektedir. Bu bulgular, *P. mirabilis* suşlarının klonal yapısını doğrular niteliktedir. *P. mirabilis* izolatlarının incelenmesinde NotI enzimi ile yapılan PFGE, plazmid profilleri ile beraber ele alındığında ayırt ediciliği yüksek, güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilmekle birlikte, *P. mirabilis* suşlarının moleküler epidemiyolojisi ile ilgili bilgilerin güncellenmesi için sürekli yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

Bu çalışma ile, *P. mirabilis*'in PFGE yöntemi ile tiplendirilmesinde kalıp hazırlama, kalıptaki bakterilerin parçalanması ve kalıpların yıkanması aşamalarında pratik olarak kullanılabilecek, çalışmanın ertesi günü sonuç alınabilen kısa süreli bir protokol geliştirilmiştir. Ayrıca geliştirilen protokolün laboratuvar içi tekrarlanabilirliği test edilmiştir.

Sonuç olarak, *P. mirabilis* tiplendirmesinde PFGE yöntemini optimize etmeyi başardığımızı, *P. mirabilis*'e yönelik moleküler yöntemlerin kalite güvencesinin sağlanması (internal kalite kontrol, EQAS programlarına katılım) için gerekli bilgi ve tecrübemizi artırdığımızı, bu alanda ülkemizde bir ilk olan çalışmamızın, bize ve yakın gelecekte bu alanda çalışmak isteyenlere önemli veriler sağlayacağını, konu ile ilgili yeni çalışmaların planlanmasını olanak tanıyacağını düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Kunin CM. Urinary tract infections: detection, prevention and management, 5<sup>th</sup> ed., Williams and Wilkins, Baltimore MD 1997;226-278.

- Johnson DE, Russell RG, Lockatell CV, et al. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 1993;61:2748-2754.
- Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:979-982.
- Centers for Disease Control and Prevention: Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). [http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli\\_salmonella\\_shigella\\_protocols.pdf](http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf).
- Guducuoglu H, Durmaz R, Yaman G, et al. Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey. *New Microbiol* 2005;28:337-343.
- Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, et al. Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. *J Clin Microbiol* 2006;44:4049-4056.
- Maslow JN, Glaze T, Adams P, et al. Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:69-75.
- Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington DC, ASM Press. 1993:563-572.
- Naseer U, Natas OB, Haldorsen BC, et al. Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing *E. coli* in Norway. *APMIS* 2007;115:120-126.
- Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, et al. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1889-1894.
- Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006;42:37-45.
- Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4328-4335.
- Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1402-1407.
- Stephens C, Francis SJ, Abell V, et al. Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill

- patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. *Am J Infect Control* 2007;35:212-215.
15. 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;18:426-439.
  16. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A et al. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000;38:4242-4245.
  17. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:481-489.
  18. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India. *J Med Microbiol* 2008;57:856-863.
  19. Gaynor K, Park SY, Kanenaka R, et al. International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers. *Epidemiol Infect* 2009;137:335-341.
  20. Saran B, Erdem B, Tekeli FA, Sahin F, Aysev AD. Ankara'da izole edilen *Shigella* kökenlerinin antibiyotik direnç modelleri, plazmid profil analizi ve değişken alanlı jel elektroforezi ile incelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2013;47:35-48.
  21. Akçalı A, Levent B, Akbaş E, Esen B. Türkiye'nin bazı illerinde izole edilen *Shigella sonnei* suşlarının antimikrobiyal direnç ve "Pulsed Field" jel elektroforezi yöntemleri ile tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2008;42:563-572.
  22. Pfaller M. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001;7:312-318.