



Mikrobiyota Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri

Molecular Diagnostic Tests in Microbiota Investigations

Nafia Canan Gürsoy, Barış Otlu

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Malatya

Gürsoy NC, Otlu B. Mikrobiyotada Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri.
J Biotechnol and Strategic Health Res. 2017;1 (Special issue): 56-67.

Özet

Son yıllarda mikrobiyotanın insan sağlığı üzerine olan potansiyel etkileri hakkında çok daha fazla veri elde edilmekte ve bazı hastalıkların patofizyolojisinde mikrobiyotanın rol oynadığına dair güçlü bulgulara ulaşılmaktadır. Bu durum, birçok farklı tıp branşının insan mikrobiyotomuna ilgi duymasına neden olmuş ve bu konudaki çalışmalar önemli düzeyde artmıştır. Böylelikle; günümüze kadar genellikle sadece patojen-odaklı olarak çalışan tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları için insan florasında bulunan ve patojen olmayan yüzlerce bakteri, mantar ve virüsün tanımlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Sahip olduğumuz tanı yöntemleri içinde kültür ve moleküler temelli yöntemlerin bu alanda etkili olarak kullanılması ile mikrobiyotomun sırları açıklanmaya başlanmıştır. Bu derlemede, mikrobiyota çalışmalarında kullanılan laboratuvar tanı yöntemleri değerlendirilerek moleküler esaslı inceleme araçları hakkındaki güncel verilerin paylaşılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, Kültür, Moleküler Tanı Yöntemleri

Abstract

In the recent years, a plenty of data has been acquired about the potential effects of the microbiota on the human health, and strong evidences have been appeared related to the roles of the microbiota on the pathophysiology of some diseases. This situation has led many medical disciplines to pay attention to the human microbiome, and the number of researches on this topic has significantly increased. Therefore, a requirement has emerged for the medical microbiology laboratories that previously used to work on the pathogen-based identifications, to identify hundreds of non-pathogenic bacteria, fungi and viruses present in the human body floras. The secrets of microbiome have been expressed as we have effectively used the available techniques among the culture-based and molecular-based identification methods. In this review, it is aimed to share the recent knowledge about the molecular-based investigation tools with evaluating the available laboratory research methods that can be utilized in the microbiota studies.

Keywords: Microbiota, Culture, Molecular Diagnostic Methods

Geliş Tarihi / Received : 26.10.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 29.10.2017

*Corresponding Author:

Prof. Dr. Barış Otlu
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Malatya

E-mail: botlu@yahoo.com

Giriş

Doğduğumuz anda sadece kendi ökaryotik hücrelerimizden ibaret olan vücudumuzun özellikle cilt yüzeyi, ağız boşluğu ve bağırsak gibi kısımları hayatımızın ilk birkaç yılı içerisinde çok sayıda bakteri, arke, mantar ve virüsler ile kolonize olmaktadır. Bu hücrelerin tamamının oluşturduğu topluluk insan mikrobiyomu olarak adlandırılır ki neredeyse vücudumuzun geri kalanındaki hücrelerin 10 katı kadar hücre içermekte, insan genomundan çok daha fazla sayıda gene sahip olmakta ve vücut ağırlığının birkaç kilosunu oluşturmaktadır^{1,2}.

Mikrobiyotanın insan sağlığı ve hastalıkları üzerindeki etkisi uzun süredir bilinmekle birlikte, kültür bağımsız tekniklerin kullanılmaya başladığı 1990'lı yıllardan itibaren mikrobiyota-konak etkileşimi ve mikrobiyota-hastalık ilişkisi ile ilgili bilgilerimizde çok önemli artışlar olmuştur. Elde edilen bu yoğun bilgi sonrasında klasik yöntemlerin bu nişin sadece temsili bir 'enstantanesini' verebildiği düşünölmeye başlanmıştır⁽³⁾. Mikrobiyota çalışmalarında kullanılan mikrobiyolojik yöntemlerin tarihsel gelişimine bakıldığında; genel olarak kültür-temelli yöntemler ve kültür-bağımsız yöntemler olarak iki grupta incelenebilir. Bu yöntemlerin sağladığı avantajlar ve dezavantajlar Tablo'da gösterilmiştir. Bu derlemede, insan mikrobiyom araştırmalarında kullanılan kültür temelli yöntemler üzerinde kısaca durulduktan sonra moleküler esaslı metotlar hakkında son yıllarda elde edilen verilerin özetlenmesi amaçlanmıştır.

Kültür-Temelli Yöntemler

İlk bakteriyel kültür ortamı, ya infüzyon ile ya da çeşitli kaynaklardan elde edilen etin enzimatik sindirimi ile hazırlanan sıvı ortamlar olmuştur. Aslen Spallanzani tarafından 18. yüzyılda geliştirilmiş ve daha sonra 19. yüzyılda Pasteur tarafından saflaştırılmış olan bu maddeler, insan hastalık bölgelerinden alınan klinik numuneler içindeki bakterilerin laboratuvar ortamında üretilmelerine olanak vermiştir. Robert Koch, bakteriyel kolonilerin üreme ve morfolojik özelliklerine göre ayrımını sağlayacak katı kültür ortamlarına ihtiyaç olduğunu belirtmiş ve patates dilimleri üzerinde ilk kez koloni oluşumunu tanımlamıştır. Koch aynı zamanda, patates dilimleri üzerinde sınırlı sayıda mikroorganizmanın üreyebildiğini belirtmiş ve büyük olasılıkla in-vitro kültüre edilemeyen organizma fenomeni ilk kez bu tarihte ortaya çıkmıştır⁽⁴⁾. Üretilen mikroorganizmaların tanımlanması için günümüze kadar izolatların in vitro üreme özel-

liklerinin temel alındığı fenotipik tanımlama tekniklerinde önemli gelişmeler yaşanmıştır. Ancak son yıllarda, "jel mikrodama" ve "mikrobiyal kültür çipleri" (microPetri dishes) gibi geliştirilen kültür yöntemleri ve ko-kültür gibi yeni yaklaşımların da kullanıma girmesiyle kültür-temelli yöntemler daha da sofistike hale gelmiştir^(5, 6, 7). Yirminci yüzyılın başına kadar spesifik mikrobiyal türler; organizmanın seçilerek üretilmesini sağlayan bir takım özel kültür ortamlarına ekilmesi ile tespit edilebiliyor; ya da Gram boyama gibi fizyolojik özelliklerinin hedef alındığı boyama yöntemleri, morfolojik koloni özellikleri, farklı kültür ortamlarında üreme özellikleri ve organizmanın oluşturduğu veya tükettiği metabolit özelliklerine bakılarak tanımlanabiliyordu. Bu yaklaşımlarla ancak *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi laboratuvar ortamında kültürü kolaylıkla yapılabilen sınırlı sayıda ve bilinen mikroorganizmanın tanımlanması mümkün olmaktadır⁽²⁾. Geliştirilen kültür teknikleriyle bakteriyel identifikasyon son derece ucuz olsa da; emek ve zaman yoğun yöntemler olduğundan ve doğada var olan toplam bakteri çeşidinin yalnızca küçük bir bölümü laboratuvar ortamında üretilebildiğinden dolayı mikrobiyal çeşitlilik açısından sınırlı bir bilgi sağlanabilmiştir^(7, 8). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada pirodizileme ile tespit edilmiş tüm fekal bakteri cinslerinin neredeyse %70'inin, ticari bazlı büyüme faktörlerinin de eklenmesiyle hazırlanan kültür ortamlarında üretilebildiği gösterilmiş olsa da⁽⁹⁾, yapılan araştırmaların çoğunda gastrointestinal mikrobiyotaya üyelerinin neredeyse %99'unun kültüre edilemediği belirtilmektedir⁽²⁾.

Kültür-Bağımsız Yöntemler

Geçmişte bakterilerin kültürü temeline dayanan yöntemler sayesinde mikrobiyotaya hakkında önemli bilgiler elde edilmiş, ancak kültür-bağımsız moleküler yaklaşımların kullanılmasıyla birlikte çoğu halen tespit edilememiş mikrobiyotaya bilgilerimizin aslında yanlış ve eksik olduğu görölmüştür⁽¹⁰⁾. Tek tek kültüre edilen mikroorganizmalardan çok direkt örnekten izole edilen DNA'nın analiz edildiği kültür-bağımsız teknikler; bize mikrobiyal toplulukların birden fazla açıdan araştırılmasına imkan vermektedir. Bunlar arasında bir toplulukta ne kadar mikroorganizma olduğu ve topluluktaki mikroorganizmaların hangilerinin hangi biyolojik işlevlere katkı sağlayabileceği, ya da sağladığını gösteren fonksiyonel metagenomikleri sayılabilir. Böylelikle insan mikrobiyotaya bozukluklarının; enflamatuvar bağırsak hastalıklarından diyabete, antibiyotik-dirençli enfeksiyonlara kadar değişen hastalıklarla her geçen gün daha fazla

ilişkili olduğu görülmüş ve gerek hastalıkların erken tespitinde bir biyomarker gerekse tedavi alanında iyi bir hedef olarak insan mikrobiyotası günümüzdeki araştırmaların canlı bir alanını oluşturmuştur⁽¹¹⁾.

Yirmi birinci yüzyıla doğru ilerledikçe mikrobiyolojide kültür bağımlı yaklaşımlardan ziyade, özellikle 16S rRNA geninin dizilenmesi gibi modern gelişmelerin ardından, sağlam/canlı bakteri hücrelerine ihtiyaç duymayan kültürden bağımsız teknikler ön plana çıkmıştır⁽¹²⁾. Kültür yöntemlerinin aksine, moleküler yöntemlerde mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılmasında hücre içindeki DNA ve RNA gibi spesifik moleküllerin tespiti amaçlanmaktadır⁽¹³⁾. Son derece yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olan bu yöntemler, özellikle de *in vitro* olarak üretilmeyen organizmalar için ekstra avantaj sağlamakta ve patojenler doğal ortamlarında veya patolojik materyalde kısa sürede tespit edilebilmektedir⁽¹²⁾.

Kullanılan ilk DNA-temelli yöntemler arasında; topluluktan izole edilen DNA'lar içerisinde, ilgilenilen genlere spesifik problemlerin kullanıldığı hibridizasyon teknikleri ya da dizileme öncesinde hedeflenen özel genlerin PCR ile çoğaltılması gelmektedir. Bu çalışmalar ile geniş bir düzeyde çeşitlilik tanımlanabilir ya da tek tek biyokimyasal fonksiyonların varlığı ya da yokluğu tespit edilebilir hale gelmiştir⁽¹¹⁾. Çoğunlukla ribozomal RNA'nın küçük bir alt-birimi olan 16S rRNA'nın dizi farklılıklarını temel alan bu tekniklerle; öncelikle mikrobiyotaya ait mikrobik çeşitlilik, mikrobiyotayı oluşturan bakteri türlerinin kalitatif ve kantitatif verileri ve ayrıca hastalık durumlarıyla ilişkili mikrobiyota çeşitliliğindeki değişiklikler araştırılabilmektedir⁽¹⁴⁾.

Mikrobiyotaya analizinde kültür-temelli ve moleküler-temelli yöntemlerin duyarlılığının karşılaştırıldığı araştırma sayısı oldukça sınırlıdır. Bunlar içinde Hayashi ve arkadaşlarının⁽¹⁵⁾ yaptığı çalışma dikkate değer veriler sunmaktadır. Bu çalışmaya göre, anaerob kültür ve 16S rRNA klon kütüphane yöntemlerini karşılaştırmış; kültür yöntemi ile mikroskopta gözlenen bakteri hücrelerinin yaklaşık %30'unun tanımlanabildiğini ve dizi analizi ile tespit edilen bakterilerin ise %75'inin kültür ile saptanamadığını bildirilmiştir.

16S rRNA Belirteç Geni

Tipki çok hücreli bir organizmada olduğu gibi; mikrobiyomu oluşturan mikroorganizma topluluğu da temelde her biri bağımsız bir genomik DNA taşıyan farklı hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşur. Mikrobiyal topluluğu oluşturan hücreler tipik olarak klonal olarak kabul edilse de, birbirine eş genomlara sahip olmayabilmektedir. Her hücredeki her bir genomun tamamen dizilenmesi pratik olmayacağı için mikrobiyal ekolojilerin tanımlanmasında farklı genomları kolaylıkla ayırt edebilecek birkaç moleküler belirteç tanımlanmıştır. Bu belirteç, genomun tamamını dizilemeye gerek kalmadan genomu temsil edebilecek özellikteki bir DNA dizisidir⁽¹¹⁾. Ribozomal RNA (5S, 16S ve 23S); bakteri türleri arasında yüksek oranda korunurken, aynı zamanda filogenetik sinyaller içeren farklı bölgelere de sahiptir. Bu sayede ribozomal RNA molekülü bakterilerin filogenetik identifikasyonu için iyi bir çalışma laboratuvarı olma özelliğindedir. Üç rRNA geni içerisinde 16S rRNA geni; PCR primerleri için en uygun kombinasyonların oluşturulabileceği korunmuş bölgeler taşıdığından ve ayrıca evrimsel kronometre gibi rol oynayan değişken bölgeler içerdiğinden, filogenetik identifikasyon için diğer iki rRNA genine kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca bakteri hücresi içerisinde binlerce kopya 16S rRNA bulunduğundan, bu gen bölgesini temel alan yöntemlerin duyarlılığının da yüksek olduğu bildirilmektedir^(16, 17).

Çoğunlukla 16S rRNA (transkripsiyon sonrası) geni ya da bazen 16S rDNA olarak adlandırılan yaklaşık 1,500 baz-çifti uzunluğundaki bu gen; bir taraftan tüm bakterilerde aynı diziyeye sahip ve son derece korunmuş bölgeler içermekle birlikte aynı zamanda bakterilerin tür ve alt-tür seviyesinde filogenetik ayırımı ve sınıflandırılmasına imkan verecek şekilde farklı genomlar arasındaki evrimsel uzaklığa orantılı olarak farklılık gösteren değişken bölgelere sahiptir. Böylelikle 16S rDNA dizisi bir belirteçte olması istenen bir çok özelliği taşıyan optimal bir çalışma hedefi olarak görülmektedir⁽¹⁸⁾. Bu şekilde gerek kültür izolatları gerekse çevresel izolatlara ait yapılmış olan sayısız seri bulunmakta ve bunlar GreenGenes⁽¹⁹⁾, Ribosomal Veritabanı Projesi⁽²⁰⁾ ve Silva⁽²¹⁾ da dahil olmak üzere daha bir çok veri tabanında kayıt altına alınmakta ve karşılaştırma yapılabilmektedir. 16S rRNA gen benzerliği ve DNA-DNA hibridizasyon yüzdesi arasındaki ilişki logaritmik bir durum sergilemekte ve bir tür tanımlanırken (DNA hibridizasyon oranı %70) dizi ben-

zerliğinin %98 olması beklenirken ⁽²²⁾, aynı cins içerisindeki farklı türler arasındaki benzerliğin ise %93.3-%99.9 olması beklenmektedir ⁽²³⁾.

Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH)

Kültürü yapılamayan toplulukların çalışılmasında kullanılan ilk metagenomik analizlerden biri floresan in-situ hibridizasyon yöntemidir. Bu yöntemde DNA izolasyonu yapılmadan bir mikrobiyal toplulukta hedef genlere spesifik floresan işaretli oligonükleotid problemler kullanılarak floresan in situ hibridizasyon (FISH) gerçekleştirilir ⁽²⁴⁾. İlk olarak bir in-situ hibridizasyon (ISH) olarak geliştirilen yöntem, Giovannoni ve arkadaşları ⁽²⁵⁾ tarafından rRNA'ya komplementer radyoaktif işaretli oligonükleotid problemler kullanılarak bakterilerin mikroskopik tespiti ile bakteriyolojide kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra geliştirilen floresan boya kullanımı ile birlikte, son on yılda flogenetik, ekolojik, tanısal ve çevresel mikrobiyoloji çalışmalarında duyarlılığı yüksek, hızlı ve güçlü bir moleküler yöntem olarak yerini almıştır ⁽²⁶⁾.

İn situ hibridizasyon yöntemiyle DNA veya RNA dizilerinin tespitinde ya klonlanmış genomik problemler ya da oligonükleotid problemler kullanılmaktadır. Hedef 16S rRNA dizisine komplementer floresan işaretli oligonükleotid problemler kullanıldığı yöntem doğrudan klinik örneğe uygulandığında düşük-çıkıtlı iken bu yöntem flow sitometri gibi sistemlerle kombine edildiğinde yüksek-çıkıtlı bir tanı metodu olarak kullanılabilir ⁽²⁶⁾. Yarı-kantitatif ve hızlı olan yöntemin en büyük dezavantajı; spesifik filum ya da türler hedef olarak seçilerek prob dizaynı yapıldığından dolayı hiç bilinmeyen türlerin tanımlanmasının mümkün olmamasıdır. Yöntemin minör sınırlılıkları ise şunlardır: I-Bazen bakterinin kendisinden kaynaklanabilen otofloresan materyale bağlı yanlış pozitiflikler, II-seçilen hedef bölgeye komplementer prob dizaynına bağlı düşük özgüllük, III-bakteriyel hücre duvar yapısına bağlı olarak düşük prob penetrasyonu sonucu yanlış negatiflikler ve IV-bakterinin üreme dönemi ve/veya bakteri türüne bağlı olarak yetersiz 16S rRNA kopya sayısı nedeniyle gözlenen düşük duyarlılık ⁽²⁷⁾. Günümüzde tanısal FISH tekniklerindeki yapılan yenilikler ile yöntemin güvenilirliği artırılmış ve kullanıcı kaynaklı farklılıkların büyük ölçüde önüne geçilmiştir. FISH problemleri ile filumdan tür düzeyine kadar her türlü taksonomik seviye hedeflenebilmektedir. Başlangıçta 16S rRNA geni nedeniyle

le bazı sınırlılıkları olan FISH, daha sonra toplulukta spesifik enzimlerin tanımlanmasını sağlayan fonksiyonel gen problemlerine kadar geniş bir alanda çalışma olanağı sunmuştur ⁽²⁸⁾. Özellikle, tek zincirli DNA problemleri yerine peptid-nükleik asit (PNA) problemlerinin kullanımı, permeabilizasyon adımlarını ortadan kaldırıp özgünlüğü artıran önemli bir gelişme olmuştur. Peptid-nükleik asit-FISH yönteminin yüksek derecede standardizasyonu sağlanmış ve klinik mikrobiyolojik analizde kullanılması amacı için Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration; FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency; EMA) onayı alınmıştır ⁽²⁹⁾. Bu yöntemle mikrobiyota konusunda yapılmış çalışma sayısı halen yeterli değildir. Rochet ve arkadaşlarının ⁽³⁰⁾ yaptıkları bir çalışmada; insan dışı mikrobiyotomu, in-situ hibridizasyon ve flow sitometri yöntemleri ile çalışmış ve 1. gün ve 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. aylarda dondurulan fekal örneğin mikrobiyotasındaki kantitatif farklılığı araştırmışlardır. Bu araştırmada, FISH yöntemi ile dondurulmuş fekal örneklerde dahi mikrobiyota kompozisyonlarının 8 aya kadar saptanabildiği gösterilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, 1980'lerin başında ortaya çıktığı andan itibaren, mikrobik etkenlerin saptanmasında vazgeçilmez bir araç haline gelmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Termotabil polimerazların ve yeni cihazların geliştirilmesiyle tek bir hedef nükleik asidin bir saatten daha kısa sürede milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir ⁽³¹⁾. Mikroorganizmaların tanımlanmasında ve filogenetik araştırmalarda daha önce de bahsettiğimiz mikrobiyal genomu temsil etmek üzere 16S rRNA geni hedef gen olarak kullanılmaktadır. Ancak tüm avantajlarının yanısıra 16S rRNA genini hedef alan tüm PCR-temelli yöntemlerin örnek alımı aşamasından PCR amplikonlarının değerlendirilmesi aşamasına kadar tüm süreçlerini kapsayan ortak bazı sınırlılıkları söz konusudur. Uygun örnek alımı, transportu ve çalışma süresince örneğin ve/veya ekstraksiyon ürünlerinin saklanma koşulları, tüm mikrobiyota analiz yöntemlerindeki en kritik basamaktır ve bu aşamalarda izlenen prosedür farklılıkları tüm sonuçları etkileyebilme potansiyeline sahiptir ⁽³²⁾. Grønseth ve arkadaşları ⁽³³⁾, solunum yolu mikrobiyota çalışmalarında örnek alımı sırasındaki orofaringeal kontaminasyonun, özellikle alt solunum yolu mikrobiyal kompozisyonuna etki ettiğini ve bu sorunun korunmuş bronkoskopik örnek alımı kul-

lanılarak minimize edilebileceğini belirtmişlerdir. Yine mikrobiyal hücrelerin farklı lizis prosedürleri nihai mikrobiyotaya kompozisyonunu etkileyen temel basamaklardan bir diğerini oluşturmaktadır. Deiner ve arkadaşları⁽³⁴⁾, altı farklı ekstraksiyon protokolü ve DNA eldesinde farklı prosedürlerin kombinasyonlarını araştırmışlar ve çalışmanın sonucunda tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek bir moleküler akış şeması uygulanması gerekliliğini vurgulamışlardır. Örneğin; tipik olarak Gram pozitif organizmalar, bakteri hücre duvarının (Gram negatif bakterilerden daha kalın olan) parçalanması için daha agresif koşullar gerektirirken, aynı koşullar Gram negatif kromozomal DNA'nın aşırı parçalanmasına neden olabilmektedir⁽³²⁾. Ayrıca, aynı türün üyelerinde bile bir bakterinin taşıdığı 16S rRNA gen kopya sayısı bir diğerinden her zaman farklı olabileceği için, bu genin kantitasyonu ile aslında tam olarak bakteri sayısı hesaplamak her zaman doğru olmayabilmektedir^(35, 36). İlginç olarak 16S rRNA gen kopya sayısındaki bu farklılık, bakterilerin mevcut kaynak kullanılabilirliğine tepkisel olarak geliştirdiği bir ekolojik strateji olarak yorumlanmaktadır⁽³⁷⁾. Amplifikasyon aşamasında, özellikle de saf olmayan örneklerden mikrobiyal tanımlama yapılacaksa, numunenin içerebileceği PCR inhibitörlerin varlığı, RNA ile çalışılacaksa, numunedeki RNase varlığı, PCR artefakt ve/veya spesifik olmayan PCR ürünlerinin oluşması, karmaşık mikrobiyotada analizinde 16S rDNA'nın evrensel ya da taksona spesifik PCR amplifikasyonu için seçilecek primerin etkinlik ve özgüllüğü gibi bir dizi sınırlamalar karşılaşılabilecek temel sorunlardır⁽³²⁾.

Parmak-izi Analiz Yöntemleri (DGGE, TGGE, T-RFLP)

Çevresel mikrobiyal toplulukların araştırılmasında kullanılan en popüler yöntemler; Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) ve Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) gibi bir örnekteki DNA parçalarının karşılaştırılmasını sağlayan moleküler parmak-izi teknikleridir. Bu yöntemlerde farklı dizi ve/veya boyutlardaki PCR ürünleri bir jel veya kapiller üzerindeki farklı hareketleriyle ayrılmaktadır⁽³⁸⁾. Her bir bandın veya pikin farklı mikrobiyal bir türü temsil ettiği varsayılarak, oluşan DNA paternlerinin direkt olarak topluluğun çeşitliliğini yansıttığı kabul edilmektedir. Aynı zamanda ilgilenilen band veya piklere ait DNA fragmanlarının seçilip dizi analizlerinin yapılmasıyla dizinin uzunluğuna bağlı olarak değişen çözünürlüklerde elde edilen veriler filogenetik araştırmalar

için kullanılabilir⁽³⁹⁾.

16S rRNA gen amplikon karışımı direkt olarak doğrusal artış gösteren formamid ve/veya üre gibi denatüre edici bir ajan gradyanı içeren poliakrilamid bir jele uygulanır. Elektroforetik bir akım uygulandığında 16S rRNA gen amplikonları jelden aşağı doğru ilerlemektedir. İlk olarak DNA parçacıkları yalnızca moleküler ağırlıklarına göre hareket ederken, daha sonra artan denatürleyici ajanın etkisiyle DNA zinciri denatüre olmaya başlar. Neredeyse tamamen denatüre edildiğinde ise jeldeki hareketleri duracaktır. DNA dizilimine bağlı olarak farklı erime sıcaklıkları oluşacak, buna bağlı olarak denatüre edici gradyanın farklı noktalarında hareket duracak ve böylece farklı diziye sahip DNA parçaları birbirinden ayrılarak bant oluşumu gözlenecektir. Türler arasında DNA dizilimi farklı olduğu için, bu şekilde tür ayrımı yapmak mümkündür. Bantların görüntülenmesi için jel boyanıp daha sonra sekans ya da prob hibridizasyon için kullanılabilir. Bu yöntemle karışık bir örnekten çok sayıda 16S tür ayrımı yapılabilmektedir⁽¹⁴⁾.

DGGE yöntemi temelde bir hastalık ile bir diğerinin ya da sağlıklı bireylerin karşılaştırmalı çalışmalarında kullanılmıştır. DGGE dışı gibi kompleks bir örnekte bulunan, aynı uzunlukta fakat farklı DNA dizilerine sahip 16S rRNA geni amplikonlarının ayrılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır⁽⁴⁰⁾. Bu konuda yapılmış çalışmalar halen oldukça kısıtlıdır. Bir araştırmada, polikistik overli (PCOS) ratlarda barsak mikrobiyotasının patogenezdaki rolünün araştırılması amacıyla PCR-DGGE kullanılmış ve PCOS' lulara sağlıklı kontrollere kıyasla *Lactobacillus*, *Ruminococcus* ve *Clostridium* türleri daha düşük bulunmuş, *Prevotella* türlerinin ise daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir⁽⁴¹⁾. Ayrıca, PCOS'lu ratlara *Lactobacillus* ve fekal transplantasyon uygulaması sonrasında hem PCOS bulgularının kaybolmaya başladığı ve hem de barsak mikrobiyotaya üyelerinin normal seviyelere eriştiği rapor edilmiştir. Çalışmada barsak mikrobiyotaya disbiyozunun PCOS patogenezi ile ilişkili olduğu ve tedavide fekal mikrobiyotaya ve *Lactobacillus* transplantasyonunun oldukça etkili olduğu vurgulanmıştır⁽⁴¹⁾.

Alioua ve arkadaşları⁽⁴²⁾ bakteriyel vajinozisli ve sağlıklı gebelerde *Lactobacillus* türlerinin dağılımını karşılaştırmak amacıyla DGGE ve 16S rRNA gen dizileme yöntemlerini kullanmışlar ve vajinal bakteri

florasında *Lactobacillus* baskınlığının bakteriyel vajinozis insidansı ile negatif korelasyona sahip olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada ayrıca *Enterococcus faecalis*'in vajinal ekosistemdeki denge-sizliğin bir göstergesi olduğu ve *L. iners* ve *L. delbruekii* türlerinin vajinanın savunması için kritik rol oynadığı vurgulanmıştır.

Hem hızlı hem de çok sayıda örneğin analiz edilebildiği bir yöntem olan DGGE tekniğinin dezavantajları ise PCR temelli sıkıntılar ve dizileme veya prob hibridizasyon yapılmadan direkt filogenetik bir tanımlamanın mümkün olmamasıdır. TGGE yöntemi de DDGE'ye benzer bir mantıkla çalışan mikrobiyotaya analiz yöntemlerinden olup, denatüre edici gradyan jel yerine doğrusal bir sıcaklık gradyanı kullanılmaktadır ⁽¹⁴⁾.

T-RFLP yöntemi restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilen 16S rRNA gen amplikonlarının oluşturduğu parçacıkların analizi temeline dayanır. Her bakteri taksonu için belli bir moleküler ağırlığa sahip bir terminal restriksiyon fragmanı oluşur ve dolayısıyla kompleks bir bakteri topluluğu analiz edildiğinde boyutu farklı olan bir dizi DNA fragmanı elde edilmiş olur. Bu terminal fragmanın PCR sırasında floresan ile işaretlenmesiyle mikrobiyal topluluk-taki çeşitlilik karşılaştırılabilir ve mikrobiyotadaki değişkenlik analiz edilebilmektedir ⁽⁴³⁾. Yarı-kantitatif, hızlı ve ucuz bir yöntem olan T-RFLP'de filogenetik tanımlamanın yapılamaması en önemli dezavantajı oluşturmaktadır. Ancak T-RFLP; fragman boyutunun hangi cins ya da türe ait olduğunu tespit edebilmek için 16S rRNA klon kütüphane analizi ile kombine olarak uygulanabilmekte ve bu kısıtlama bertaraf edilebilmektedir ⁽⁴⁴⁾. Zakharkina ve arkadaşları ⁽⁴⁵⁾ sağlıklı bireylerin ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan kişilerin akciğerlerindeki mikrobiyotaya kompozisyonunu ana-liz etmek amacıyla; T-RFLP ve klon kütüphane analizi yöntemle-rini birlikte kullanmışlar ve üst ve alt solunum yollarının benzer mikrobiyotaya kompozisyonuna sahip olduğunu ve gerek sağlıklı popülasyonda gerekse KOAH hastalarında ağırlıklı olarak *Prevotella*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, ve *Streptococcus* türlerinin bulundu-ğunu bildirmişlerdir.

Kantitatif PCR (qPCR)

Nükleik asitlerin tespiti ve kantitasyonunda kullanılan DGGE ve

T-RFLP gibi yarı-kantitatif geleneksel PCR-temelli yöntemler bir örnekteki mevcut DNA'nın gerçek kantitasyonunda yeterli değildir. Bu amaçla geliştirilen kantitatif PCR (qPCR=gerçek-zamanlı PCR) ile klinik örnekteki hedef nükleik asitlerin tespitine ek olarak kantitasyonu da yapılabilmektedir ⁽¹⁴⁾. Standart PCR yönteminde elde edilen amplikonların agaroz jel üzerinde elektroforetik olarak ayrıştırıldığında oluşan bantlar sayesinde sadece hedef DNA'nın varlığı veya yokluğu belirlenebilmektedir. Standart klasik PCR ile benzer bir teknik olan qPCR yönteminde farklı olarak PCR karışımına çift zincirli DNA'ya (PCR ürününe) bağlandığında floresan ışımaya yapan floresan boyalar veya floresan boya işaretli problemler eklenmekte ve bilgisayar kontrollü bir ortamda amplifikasyon süreci gerçek zamanlı olarak izlenebilmektedir. qPCR'ın geliştirilmesiyle PCR'ın klinik kullanımı daha da artmıştır. Bu yöntemde kısaca; miktarı bilinen hedefe sahip örneğin belli bir eşik değerinde floresan verdiği PCR siklusu tespit edilip CT (CT=the threshold cycle) bir referans değer belirlenir ve buna göre bir standart eğri oluşturulur. Klinik örneğin CT değeri standart eğriye karşılaştırılarak hedef nükleik asit miktarı hesaplanmaktadır ⁽⁴⁶⁾. Örnekteki floresan miktarı ile PCR siklus sayısı logaritmik bir ölçek kullanılarak kıyaslanır ve örnekteki DNA miktarı, kopya sayısı bilinen pozitif kontrol ile oluşturulan standart eğri referans alınarak kantitatif olarak belirlenebilir ⁽⁴⁷⁾. Floresan sinyal yoğunluğu örnekteki DNA miktarı ile orantılıdır. Aday primerler, toplam bakteri yükü bilgisi gerekiyorsa, tüm bakteri filumlarını kapsayacak şekilde veya tek bir filum ya da bakteri türünü hedef alacak şekilde tasarlanabilmektedir ⁽¹⁴⁾. Geniş kantitasyon aralığı, yüksek tekrarlanabilirlik (<2% standart sapma), yüksek duyarlılık (<5 kopya) ve yüksek özgüllük özellikleri nedeniyle qPCR atık su sistemleri gibi karmaşık ekosistemler de dahi mikrobiyal ekoloji ve mikrobiyotaya çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir ⁽³⁹⁾.

Yöntemin diğer avantajları arasında; filogenetik ayırım, hız ve spesifik türleri hedefleyen primer dizayn edilebilme imkanı bulunmaktadır. Toplam mikrobiyal yükün ölçülebildiği ve doğruya en yakın sonuç verebilen kültür-bağımsız bir yöntemdir. Ayrıca ticari olarak qPCR kitleri kolaylıkla temin edilebilmekte ve diğer teknikleri kullanma imkanı olmayan laboratuvarlarda da kullanılabilir ⁽¹⁴⁾. Burada bahsedilmesi gereken qPCR yöntemine ait en önemli dezavantajlar ise elde edilecek kantitasyon verilerinin geçerliliği-

ni etkileyebilecek PCR yönteminin genel kısıtlamalarının yanısıra, kapsamlı bir ön analiz yapılmadığı sürece belirli bir primer kombinasyonunun olmaması ve yeni türlerin tanımlanamamasıdır. Ayrıca; emek yoğun, primer/prob dizaynına zorlayıcı ve uzmanlaşma gerektiren bir tekniktir⁽³⁹⁾.

qPCR ile yapılan mikrobiyotaya çalışmalarına bakıldığında Shukla ve arkadaşlarının⁽⁴⁸⁾ araştırması dikkat çekicidir. Bu çalışmada, irritabl barsak sendromlu (IBS) hastalar ile sağlıklı bireylerin belirli fekal mikrobiyotaya üyelerinin kantitasyonu amacıyla qPCR yöntemi kullanılmış ve çalışmanın sonuçlarına göre; genel olarak IBS hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla Gram-pozitif bakterilerin azaldığı, ancak diğer taraftan özellikle *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides thetaiotamicron* ve *Veillonella* türlerinin artış gösterdiği saptanmıştır. Çalışılan tüm IBS hastalarında *P. aeruginosa*'nın artış göstermesi, hastalığın patofizyolojisinde bu bakterinin önemli rol oynayabileceği fikrini doğrulamıştır⁽⁴⁸⁾.

DDGE veya DNA mikrodizi gibi yarı-kantitatif sonuç veren yöntemler ile qPCR kombinasyonu kullanılarak mikrobiyotaya çeşitliliği ve sayısal analizi konusunda çok daha detaylı bilgi elde edilebilir. Örneğin, Murri ve arkadaşları⁽⁴⁹⁾ tip 1 diyabetli çocuklar ile sağlıklı çocukların barsak mikrobiyotaya kompozisyonundaki farklılığı ve kantitasyonlarını değerlendirmek amacıyla qPCR ve DDGE yöntemlerini birlikte kullanmışlardır. Bu çalışma tip 1 diyabet ile barsak mikrobiyotasının kompozisyonel değişikliğini ilişkilendiren ilk çalışma olup, ayrıca Firmicutes/Bacteroidetes oranının diyabetli gruptaki glisemik düzeyle ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Yine aynı çalışmada barsak bütünlüğünün korunmasında önemli olan bakteri türlerinin diyabetli çocuklarda oldukça düşük sayıda olduğu ve dolayısıyla tip 1 diyabet gelişiminin kontrolü için barsak mikrobiyotasının modifikasyonu temeline dayalı yeni stratejiler geliştirilebileceği belirtilmiştir⁽⁴⁹⁾.

Dijital PCR (dPCR)

Dijital PCR (dPCR) üçüncü jenerasyon PCR teknolojisi olarak tanımlanan ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan yeni bir yöntemdir. Standart bir eğri olmadan mutlak kantifikasyon yapılabilmesi, artmış duyarlılık, inhibitör varlığında artmış doğruluk ve amplifikasyon verimliliği düşük olduğunda bile doğruya çok yakın

kantitasyon yapılabilmesi gibi avantajları sayesinde qPCR yönteminde karşılaşılan kısıtlamaları bertaraf edeceği düşünülmektedir^(50, 51).

Dijital PCR yönteminde; bir örnekteki DNA moleküllerinin sayısı qPCR' dan farklı olarak DNA amplifikasyon reaksiyonuna floresan bir boya eklenmeden ve PCR CT değeri ve standart eğri oluşturulmadan elde edilmektedir. Bunun yerine dPCR'da amplifikasyon reaksiyonu; mikroplattlar, kapiller, yağ emülsiyonları veya diziler kullanılarak birbirinden bağımsız binlerce farklı bölmelere ayrılmıştır. Bölmeler oluşturulurken istenen durum her bir reaksiyon karışımının ya tek bir hedef molekülünü içermesi ya da hiçbirini içermemesidir. Bölümlendirilmiş reaksiyonlar çoğaltılarak pozitif ve negatif bölmeler sayılır. Pozitif ve negatif bölme sayısına bağlı olarak da örnekteki hedef kopya sayısı hesaplanır^(52, 53). Hedef konsantrasyonu artınca, belirli bir bölmenin iki veya daha fazla kopya içermeye ihtimali artacaktır ki bu durumda her bir bölmedeki hedef DNA sayısını ve orijinal numunedeki kopya sayısını doğru bir şekilde hesaplamak için Poisson Yasası kullanılır^(50, 54).

Bir dPCR karışımındaki DNA kopya sayısının sapmalar olmadan belirlenebilmesi için bazı şartların yerine getirilmesi gerekir. İlk olarak hedef DNA bölmelere rastgele ve ideal olarak herbir bölmede birden fazla hedef molekül olmayacak şekilde dağıtılmalıdır. Buna bağlı olarak da klinik olarak yeterli sayıda hedef içeren örnekler için, Poisson Yasasına göre gerekli dilüsyonların yapılabileceği kadar bölme (10,000 ila 100,000) gerekmektedir. Beklenen hedef sayısı bölme sayısına eşit veya daha büyük olan örneklerde, doğru kantitasyon için örneğin dilüsyonu gerekir. Herbirinin aynı sayıda hedef molekül içerebilmesi için bölmelerin aynı boyutta olması gerekmektedir. Son olarak da pozitif ve negatif bölmeler arasında net bir ayırım yapılabilmesini sağlayacak şekilde, hedef molekül içeren tüm bölmelerde yeterli verimlilikte amplifikasyon sağlanmalıdır^(50,54).

Bu şartları sağlayacak çeşitli ticari dPCR platformları geliştirilmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yerini almıştır. Bunlar arasında; çip üzerindeki reaksiyon kuyucuklarında örnekleri bölümlendiren BioMark HD (Fluidigm, South San Francisco, CA), Clarity (JN Medsys, Singapore), ve QuantStudio 12K Flex and 3D Instruments

(Thermo Fisher, Waltham, MA) ve ayrıca yağ içinde su damlacıkları kullanarak örnekleri bölmelendiren RainDrop (RainDance, Billerica, MA) ile QX100 ve QX200 instruments (Bio-Rad, Hercules, CA) sistemleri sayılabilir. qPCR'da olduğu gibi, tüm dPCR platformlarında da farklı bir cihaz ile örnekten nükleik asit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi ve PCR primer ve prob dizaynı ve konsantrasyonunun optimizasyonu gerekmektedir^(50, 51).

DNA Mikroarray

Mikrobiyal toplulukların profilinin çıkarılmasıyla ilgili ilk çalışmalar yeni nesil dizileme yöntemleri ve Sanger dizileme ile elde edilmiş olsa da, son yıllarda bu amaçla filogenetik mikrodizi ve DNA çip olarak da bilinen yüksek-çıkıtlı teknolojiler geliştirilmiştir. Topluluk üyelerinin 16S rRNA genine komplementer oligonükleotid problemleri içeren bu çipler ile örnekler ve örnek grupları arasında mikrobiyotaya kompozisyonunun direkt kantitatif karşılaştırılması yapılabilmektedir. PhyloChip, Microbiota Array ve HITChip gibi bazı gelişmiş array'ler, aynı anda tek bir örnekteki yüzlerce ve binlerce filotip varlığını ve bolluğunu ölçebilmektedir⁽⁵⁵⁾. Günümüze kadarki süreçte topluluk genom array'i, fonksiyonel gen array'i ve filogenetik mikroarray'ler de dahil olmak üzere mikrobiyal toplulukların fonksiyonunu ve kompozisyonunu tespit edebilecek çeşitli mikroarray sistemleri geliştirilmiştir⁽⁵⁶⁾. Topluluk genom array'leri saf kültür halindeki suşlardan izole edilmiş tüm genomik DNA'nın kullanılmasıyla oluşturulmuş ve basit ve kompleks topluluklardaki suşların ve tek başına türlerin tespitini sağlayacak şekilde dizayn edilmiştir⁽⁵⁷⁾. Fonksiyonel gen array'leri çeşitli biyokimyasal süreçlerde yer alan temel enzimleri kodlayan genlere özgü problemler içermekte ve mikrobiyal topluluklardaki fizyolojik değişikliklerin izlenmesine olanak sağlamaktadır⁽⁵⁸⁾. Fonksiyonel gen array'leri içerisinde mükemmel denilebilecek bir örnek GeoChip olup; karbon, azot, fosfor ve kükürtün biyojeokimyasal döngüsünde yer alan genler, metal ve antibiyotik direnci için genler ve organik bileşiklerin biyoremediasyonunu kodlayan genler için 84.000 oligonükleotid prob içermektedir^(59, 60). Filogenetik oligonükleotid array'ler (filoarray'ler) 16S rRNA dizilerine komplementer problemler içermekte ve böylelikle mikrobiyotaya kompozisyonu yapı ve varyansının analizi için son derece uygundur⁽⁵⁵⁾.

Yapılan çalışmalarda DNA mikrodizinin %0.00025 oranındaki bak-

teriyel DNA'yı saptayabilecek duyarlılıkta olduğu gösterilmiştir⁽⁵⁵⁾. Tekniğin avantajları hızlı, yarı-kantitatif ve örneğin aynı anda tüm türler için test edilebilmesidir. Aslında kalitatif olan yöntemde, hibridize dizilerin yoğunluğu nicelenir ve elde edilen veriler, ayrıntılı istatistiksel veya kantitatif analizlere tabi tutulur. Yöntemin en önemli dezavantajı çapraz-hibridizasyon (çok sayıda probun tek hedefe hibridizasyonu) ihtimalidir⁽¹⁴⁾.

Dizi Analiz Yöntemleri

Bir örnekteki 16S rRNA gen amplikonunun tanımlanması ancak baz çiftleri sırasının çeşitli yöntemlerle tahmin edilmesi (dizileme) ile sağlanabilir. Dizileme yöntemi tür seviyesindeki identifikasyon için altın standart yöntem olarak kabul görmektedir. Geleneksel yöntemlerle dizi analizi yapılırken, fosfodiester bağının oluşması için gerekli olan 3'-hidroksil grubu çıkarılmış nükleotid baz analogları (dideoksinükleotid) kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma yöntemi olarak da bilinen klasik dizilemede, modifiye nükleotidler sayesinde DNA polimeraz enzimi ile daha fazla nükleotid eklenmesi engellenmiş olmaktadır⁽⁶¹⁾. Sanger dizileme yöntemi az sayıda örnek çalışan çoğu laboratuvarında halen rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak sindirim sistemi gibi milyonlarca sayıdaki mikroorganizmayı barındıran kompleks mikrobiyal ekosistemler çalışılırken, mikrobiyal kompozisyonun temsili bir görünümünü elde etmek için binlerce PCR amplikonunu tek tek klonlamak ve dizilemek gerekecektir ki bu da sık uygulanabilir pratik bir yaklaşım olmayacaktır.

Mikrobiyal toplulukların etkin oranda araştırılmasında kullanılan mevcut çalışmaların neredeyse tamamı, çoğunlukla proteomik ve metabolomik gibi diğer genom ölçekli platformlar ile kombine edilen yüksek-çıkıtlı DNA dizileme çalışmalarından oluşmaktadır. Bin dokuz yüz yetmişlerden beri var olan DNA dizileme yöntemi; mikrobiyotaya ve/veya çevresel DNA dizilemede ek zamana ve klon kütüphanelerinin oluşturulmasında ekstra maliyete gerek duyulduğundan bu tarihsel süreçte yaygın olarak kullanılamamıştır⁽¹¹⁾. Mikrobiyotaya çalışmalarının hızlanması için gerekli olan, tüm genom, shotgun ve de nova dizilemenin geliştirilmesi için ise 50 yıl daha beklenmesi gerekmiştir. Bu gecikmenin nedenlerinin başında, tüm genom dizilemesinin ve matagenomik çalışmaların yaklaşılamaz bir hedef olarak düşünülmesi gelmektedir. Ancak mikroelektronik ve yazılım alanındaki gelişmelerle birlikte insan genom projesinin

başlaması bu alandaki itici güç olmuştur. Yeni nesil yüksek-çıkıtlı dizileme teknikleri 2005'den itibaren yaygınlaşmış, kompleks DNA içeren örneklerdeki tüm DNA'ların hızlı ve ekonomik olarak dizilenmesi yapılabilir hale gelmiş ve metagenomik çalışmalar bu tarihten itibaren yaygınlaşmıştır⁽¹¹⁾. Bu teknolojik gelişmeler; insana olan ilgiyi arttırmış ve sürekli etkileşim içerisinde olan insan ve mikrobiyal bileşenlerinin bir süper-organizma olarak görülmesini sağlamıştır. Bu tür etkileşimler karmaşık olabilmekte ve geleneksel konak-patojen ve bağışıklık-virülans modellerinin çok ötesinde birçok seviyede ortaya çıkabilmektedir⁽⁶²⁾. Örneğin, insan genomunun %5-8'inin endojen retrovirüslerden oluştuğu⁽⁶³⁾, bağırsak bakterilerinin L-karnitin'in metabolik bozunumu yoluyla kardiyovasküler hastalık riskini artırabildiği⁽⁶⁴⁾ ve bağırsak mikrobiyotasının henüz bilinmeyen mekanizmalarla yaşlılarda daha sağlıklı bir hayat sağlayabildiği görülmüştür⁽⁶⁵⁾. Böylece insan sağlığının pek çok açıdan, bizimle bütünsel olan, sürekli etkileşim içerisinde olduğumuz ve her yerde bulunabileceği görülen mikrobiyotamızdan etkilenebileceği görülmeye başlanmıştır.

16S rRNA'nın yeni nesil dizileme teknikleriyle birleştirilmesi çok sayıda örneğin uygun maliyetle çalışılabilirliğini sağlamıştır. Ancak yine daha önce de bahsettiğimiz üzere 16S rRNA dizilenmesi ile ilgili; gerek primer dizaynında yaşanan zorluklar veya PCR işlemi sırasındaki kontaminasyon gibi sıkıntılar ve gerekse 16S rRNA operonunun kopya sayısının sabit olmaması gibi kısıtlamalarla karşılaşmıştır. Bu kısıtlamalar 16S rRNA dizilemesinin doğruluk, özgüllük ve duyarlılıklarını önemli oranda etkilemiştir.

rRNA gen analizlerinde "benzersiz" bir dizinin kesin olarak tanımlanabilmesinde biyoinformatik bazı sorunlar çıkmaktadır. 16S rRNA geninin büyük bir bölümü son derece korunmuş dizilerden oluşmuş, ancak bu diziler arasında değişken ya da hiper-değişken diziler de bulunmaktadır ki oldukça küçük baz çiftinden oluşmuş bu bölgeler evrimsel süreçte çok kısa zaman diliminde değişime uğrayabilmektedir. Horizontal transfer, çoklu kopya veya belirsiz rDNA markırları ve diğer kafa karışıklığına yol açacak durumlar, "tür"ün biyolojik anlamını bulanıklaştırdığı gibi teknik olarak bu tarz problemleri çözmeyi de zorlaştırmaktadır⁽⁶⁶⁾. Bunun dışında, 16S bölgeleri tipik olarak sadece tek bir geçişle dizilenir. Bu nedenle de en azından bir dizileme hatası içerecek şansları vardır. Bunun

anlamı %100 uyumlu dizilerin etiketlenilmesi son derece tutucu bir yaklaşım olup, bu tür bir yaklaşımla klonal genomların farklı organizmalar olarak tanımlanması kaçınılmazdır. Bu nedenle de bir miktar dizi farklılığına göz yumulmakta, pratikte dizi benzerlik eşik değeri genellikle %95, %97 veya %99 olarak alınmakta⁽⁶⁷⁾ ve neredeyse özdeş etiketlerden oluşan (ve dolayısıyla aynı genomlar olduğu varsayılan) kümeler Operasyonel Taksonomik Birimler (Operational Taxonomic Units=OTUs) veya bazen filotip olarak kabul edilmektedir. Yaklaşık %99 dizi benzerliği çoğunlukla tür düzeyini ve %97 benzerlik seviyesi ise cins düzeyinde tanımlama için kullanılmakla birlikte bazı bakterilerde sadece aile seviyesinde filogenetik gruplandırma yapılabilmektedir⁽⁶⁷⁾. Belirlenen bu OTU'lar tanımlanmış organizmalara ait veritabanları ile karşılaştırılarak etiketlenir ve filogenetik tanımlamanın doğruluğu seçilecek veritabanıyla doğrudan ilişkilidir. Gen bankasındaki (GenBank, NIH) 16S rRNA dizilerinin %5 kadarının hatalı olabileceği bildirilmiştir⁽⁶⁸⁾. Dizilerin kalite değerlendirmesi ve hizalamalarının manuel olarak optimize edildiği Ribozomal Veritabanı Projesi⁽²⁰⁾, GreenGenes⁽¹⁹⁾ ve SILVA⁽²¹⁾ gibi veritabanları, test edilen dizilerin optimal filogenetik yerleşimi için çok önemlidir⁽⁶²⁾. OTU'lar daha sonra varlık/yokluk, bolluk veya filogenetik çeşitlilik açısından analiz edilebilir. Topluluktaki biyomoleküler ve metabolik fonksiyonların belirlenmesi için, total metagenomik DNA dizilenip fonksiyona yönelik veritabanları ile karşılaştırılabilir veya dizilenen topluluk DNA'sı referans genomlar ile karşılaştırılabilir. Bu da mikrobiyal dizi varyantlarının ve polimorfizmlerin tanımlanmasına ve ayrıca spesifik organizmaların varlığı ve bolluğunun belirlenmesine olanak sağlar. Gelecekte, ortaya çıkacak metatranskriptomik, metaproteomik ve metametabolomik alanları; mikrobik topluluklardaki gen ekspresyonu ve etkileşimlerinin bütünsel bir resmini oluşturmaya yardımcı olacaktır⁽¹¹⁾.

Tüm genom dizileme, bir organizmanın fonksiyonunun kapsamlı bir şekilde anlaşılmasının temelini oluşturmaktadır. İlk olarak 1995 yılında Haemophilus influenzae'nın tüm genom dizilmesi yapılmış⁽⁶⁹⁾ ve bugün Ulusal Biyoteknoloji Enstitüsü Bilgi Merkezi'nin (NCBI) mikrobiyal genom sitesinde listelenmiştir.

Dizileme yöntemi bazlı olarak geliştirilmiş dört ana yaklaşım şunlardır.

Klonlanmış 16S rRNA Gen Amplikonlarının Dizilenmesi

Klonlanmış 16S rRNA geninin tamamının dizilenmesinde, dideoksinükleotidler ile zincir sonlandırma temeline dayanan Sanger yöntemi kullanılmaktadır⁽¹⁷⁾. Bu şekilde mikrobiyotanın kantitatif ve filogenetik olarak tanımlanması ve kültürlenmemiş bakterilerin analiz edilmesi mümkündür. Ancak yöntemin en önemli sınırlaması; çok sayıda klonun oluşturulması, işlenmesi ve analizi gerektiğinden pahalı ve emek-yoğun olmasıdır⁽¹⁴⁾.

Yeni Nesil Dizileme

Yeni Nesil Dizileme yöntemleri, düşük maliyet ile ve hızlı bir şekilde dizilerin elde edildiği yöntemleri kapsamaktadır. Ticari olarak 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GmbH Ltd, Mannheim, Germany), Illumina® (Illumina, San Diego, CA, USA) ve SOLiD™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gibi versiyonları geliştirilmiştir. Bu yeni nesil dizileme yöntemlerinde tipik olarak klonlanmış amplikonlar yerine, direkt DNA amplikonu ya da total topluluk DNA'sı kullanılır⁽¹⁴⁾.

16S rRNA Gen Amplikonlarının Direkt Dizilenmesi

Çok sayıda kısmi 16S rRNA gen amplikonlarının masif paralel dizilenmesinde, yani aynı anda ve aynı reaksiyon içerisinde dizilenebilmesi için, boncuklar (454 Pyrosequencing®), slaytlar (Illumina®) ve katı yüzeyler (SOLiD™) kullanılır. Pyrosequencing ile tek seferde %99 ve daha yüksek doğrulukta 500 milyon baz dizilenebilmektedir. Bu da Sanger dizilemenin yaklaşık iki bin katı kadar bir çıktı alınması demektir⁽¹⁴⁾. Yöntemin diğer avantajları; filogenetik identifikasyon, bilinmeyen bakterilerin tespit ve/veya tanımlanması, hızlı olması ve kantitatif veri elde edilebilmesidir. Masif paralel dizileme orta derecede pahalı bir yöntemdir. Yeni bir mikrobiyal genomun yüksek standartta dizilenmesi yaklaşık 5,000\$ olup, referans genomu bulunan bir türün dizilenmesi ise 500\$'dan daha az maliyetlidir⁽¹⁴⁾. 454 Pyrosequencing® yönteminin başlıca kullanım alanlarına; farklı hastalık durumlarındaki mikrobiyotaya karşılaştırma çalışmaları ve antibiyotiklerin mikrobiyotaya üzerindeki etkileri örnek olarak verilebilir.

Mikrobiyom Shotgun Dizileme ve Metagenomik

16S rRNA temelli geliştirilen yöntemler sayesinde mikrobiyotaya kompozisyonuna dair bilgilerimiz artmış ve sağlıklı bireylerle çeşitli

hastalık durumlarındaki mikrobiyotaya değişikliklerini görme imkânını yakalamış da olsak, elde edilen mikrobiyal patern ile hastalık arasındaki ilişkinin biyolojik ya da klinik önemi konusunda yeterli veri elde edilememiştir. Yani mikrobiyal patern hastalığın nedeni mi yoksa hastalığı etkileyen bir durum mu? Bu bağlamda bize yarım edecek mikrobiyotaya analizindeki en yeni ve kapsamlı teknoloji metagenomik (çevresel genomik ya da topluluk genomu) çalışmalarıdır⁽¹⁴⁾.

Metagenomik tekniği ilk olarak 1998 yılında Handelsman tarafından toprak mikrobiyotasının araştırılması amacıyla kullanılmıştır. Bu tarihten itibaren de insan mikrobiyom projesi de dahil birçok çalışmada kullanılmaya başlamıştır. Bu teknik, örnekteki belirli DNA parçalarının dizilenmesi yerine tüm DNA fragmanlarının temsili bir örneğinin dizildiği tek yöntemdir⁽¹⁴⁾.

Sonuç

Mikrobiyotaya çalışmalarının farklı uygulamaları için geliştirilmiş kantitatif, kalitatif veya her ikisinin bulunduğu sonuçlar verebilme potansiyelinde çok sayıda moleküler teknik bulunmaktadır. Bir mikrobiyotaya çalışması planlanacağı zaman, hangi tekniğin kullanılacağına karar verirken maliyetin ve ihtiyaç duyulan analiz derinliğinin göz önünde tutulması gerekmektedir. Son zamanlarda geliştirilen yüksek-çıkıtlı teknikler, mikrobiyotaya üyelerinin filogenetik karakterizasyonu ve mevcut organizmaların kantitasyonlarını sağlamaları açısından avantajlıdır. Diğer yöntemlere kıyasla pahalı olmakla birlikte, tekniklerin maliyetleri geçmişe kıyasla düşmektedir.

İnsan mikrobiyotası ile ilgili mevcut moleküler çalışmaların çoğu, klinik ölçümlerle belirli OTU'ları veya organizmaları ilişkilendirmeye çalışan hipotezler üretmek üzere yapılmaktadır. Bunlar hastalıkların biyolojik belirteçleri olarak yararlı bilgiler vermektedir. Ancak 16S rRNA dizilemesi, tüm genom dizileme ve metagenomik çalışmalar ile metabolomik, metaproteomik ve metatranskriptomik gibi mikrobiyal topluluğun aktivitesinin ölçülmesine yönelik çalışmaların kombine edilmesi ve böylece mikrobiyotaya-konak etkileşiminin gerçek anlamda ortaya konulması daha yararlı olacaktır. Bu sayede hastalık önleme ve yönetimi için yeni stratejiler geliştirilebilecektir.

Kaynaklar

- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464(7285): 59-65.
- The Human Microbiome Project Consortium 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 486: 207–214.
- Zoetendal EG, Vaughan EE, De Vos WM. A microbial world within us. *Mol Microbiol*. 2006; 59(6): 1639–50.
- Wade W. Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2002; 95(2): 81–83.
- Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, et al. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 15681–6.
- Ingham CJ, Sprengels A, Bomer J, Molenaar D, van den Berg A, Vlieg JETVH et al. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 18217–18222.
- Stewart EJ. Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol*. 2012;194:4151–4160.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308(5728):1635–8.
- Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(15): 6252–7.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*. 1998;180(18):4765–4774.
- Morgan X, Huttenhower C. Chapter 12: human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8:12.10.1371.
- Austin, B. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017; 110: 1247.
- Zuckerkind E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*. 1965; 8, 357-366.
- Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9: 312–22.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol. Immunol*. 2002; 46, 535–548.
- Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbial Res* 2011; 166: 99–110.
- Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17(4):840–862.
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, et al. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 1980; 209: 457–463.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(7):5069–5072.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(suppl 1):D141–D5
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(21):7188–7196.
- Devereux R, He S, Doyle C, Orkland S, Stahl D, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology*. 1990; 172: 3609–3619.
- Moore ERB, Mua M, Arnscheidt A, Böttger EC, Hutson RA, Collins MD, et al. The determination and comparison of the 16S rDNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Syst. Appl. Microbiol*. 1996; 19, 476–492.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 1995; 59(1):143–169.
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*. 1988;170(2):720–726.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990; 56(6): 1919–25.
- Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41:85–112.
- Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2004;68(4):669–85.
- Alexander BD, Ashley ED, Reller LB, et al. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54: 277–82.
- Rochet V, Rigottier-Gois L, Rabot S, Doré J. Validation of fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry for assessing interindividual variation in the composition of human fecal microflora during long-term storage of samples. *J Microbiol Methods*. 2004; 59: 263–270.
- Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003; 226: 3–6.
- Wintzingerode FV, Göbel UV, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*. 1997; 21: 213–229.
- Grønseth R, Drengenes C, Wiker HG, et al. Protected sampling is preferable in bronchoscopic studies of the airway microbiome. *ERJ Open Research*. 2017;3(3):00019-02017.
- Deiner K, Walser J-C, Mächler E, Altermatt F. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*. 2015; 183: 53–63.
- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rRNA operons. *J. Bacteriol*. 2004; 186, 2629–2635.
- Lee CM, Sieo CC, Abdullah N, Ho YW. Estimation of 16S rRNA gene copy number in several probiotic *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. *Kneifel W, ed. Fems Microbiology Letters*. 2008; 287(1): 136–141.
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rncdb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29(1): 181–184.
- Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *J Microbiol Meth*. 2006;

- 66: 1–20.
39. Kim J, Lim J, Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol. Adv.* 2013; 31, 1358–1373.
40. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology.* 1993; 59(3): 695–700.
41. Guo Y Qi Y, Yang X, Zhao L, Wen S, Liu Y, et al. Association between Polycystic Ovary Syndrome and Gut Microbiota. *PLoS One.* 2016; 11(4).
42. Alioua S, Abdi A, Fhoula I, Bringel F, Boudabous A, Ouzari IH. Diversity of Vaginal Lactic Acid Bacterial Microbiota in 15 Algerian Pregnant Women with and without Bacterial Vaginosis by using Culture Independent Method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2016;10(9).
43. Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol.* 2000; 2(1): 39–50.
44. Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 557–570.
45. Zakharkina T, Heinzel E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, et al. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS One.* 2013; 8: e68302
46. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292–1305.
47. Carey CM, Kirk JL, Ojha S, Kostrzynska M. Current and future uses of real time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota and probiotic use and effectiveness. *Can. J. Microbiol.* 2007; 53: 537–550.
48. Shukla R, Ghoshal U, Dhole TN, Ghoshal UC. Fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls using real-time polymerase chain reaction: an evidence of dysbiosis. *Dig Dis Sci.* 2015;60:2953–2962.
49. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med.* 2013; 11:46.
50. Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol.* 2017; 55(6): 1621–1628.
51. Low H, Chan SJ, Soo GH, Ling B, Tan EL. Clarity™ digital PCR system: a novel platform for absolute quantification of nucleic acids. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 409: 1869–1875.
52. Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14: 501–507.
53. Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75:1–4.
54. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 2015; 61: 79 – 88.
55. Paly O, Agans R. Application of phylogenetic microarrays to interrogation of human microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 79(1): 2–11.
56. Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6: 288–294.
57. Wu L, Thompson DK, Liu X, Fields MW, Bagwell CE, Tiedje JM, Zhou J. Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environ Sci Technol.* 2004; 38(24): 6775–82.
58. He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, et al. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *The ISME journal.* 2007;1(1):67–77.
59. Zhou J, He Z, Van Nostrand J, Wu L, Deng Y. Applying GeoChip Analysis to Disparate Microbial Communities. *Microbe.* 2010;5:60–65.
60. Zhou JZ, He ZL, Van Nostrand JD, Deng Y. Development and applications of functional gene microarrays in the analysis of the functional diversity, composition, and structure of microbial communities. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China.* 2011;5:1–20.
61. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977; 74(12): 5463–5467.
62. Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: R88–94.
63. Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(14):4894–9.
64. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine.* 2013;19(5):576–585.
65. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108 Suppl 1:4586–91.
66. Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 431–440.
67. Schloss PD (2010) The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol* 6: e1000844.
68. Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J. and Weightman, A.J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71, 7724–7736.
69. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A. and Merrick, J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995; 269, 496–512.