



Canlı *Legionella pneumophila* Tespiti ve MLST için Gerçek Zamanlı PCR ve HRM Analizi Tabanlı Yöntemlerin Geliştirilmesi



Selin Nar Ötgün, Meral Turan, Mustafa Kolukırmık, Esra Arslan Ganiler, Nuriye Ünal,
Betül Gümüşlüoğlu, Canan Ketre, Selçuk Kılıç

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı, Ankara
Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Ltd Şti, İstanbul Teknik Üniversitesi Arı Teknokent, İstanbul



**LEJYONER
HASTALIĞI**

→ *Legionella* bakterilerinin oluşturduğu akut enfeksiyon



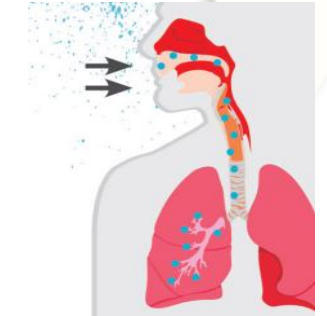
Epidemiyoloji

- 1) *Legionella* bakterileri doğada yaygın
- 2) İnsan yapımı su sistemlerine geçer
- 3) Kaynaktan aerosol inhalasyonu veya aspirasyon ile yayılır
- 4) Toplum / hastane kaynaklı LH



Klinik

- 1) Duyarlı bireylerde pnömoni
- 2) Yüksek ateş, bradikardi
- 3) Beta laktam ab'e yanıtızsızlık
- 4) Vaka ölüm oranı %10, hastane kaynaklı vakalarda ise %30-40





LEJYONER
HASTALIĞI

➔ *Legionella* bakterileri, **çevresel kaynaktan yayılarak salgın yapma potansiyeli** nedeniyle önemli bir HALK SAĞLIĞI sorunu

Korunma
ve kontrol

- 1) Ülkemizde “Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı”
- 2) Yönetmelik ve Rehber (2015)
- 3) Bildirimi zorunlu hastalık
- 4) Sağlık Bakanlığı ELDSNet işbirliği

Tanı

Çevresel örneklerin tanısı

- 1) Kültür
- 2) PCR

Klinik örneklerin tanısı

- 1) Üriner antijen
- 2) Kültür
- 3) PCR
- 4) Seroloji



Amaç

- 1) *Legionella* tespiti için kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile
- 2) Çoklu bölge DNA tiplendirmesi için yüksek çözünürlükte erime (HRM) analizi tabanlı yöntemlerin geliştirilmesi

Kullanım alanı

- Suda *Legionella* spp, *Legionella pneumophila*, *Legionella pneumophila* SG1'in qPCR ile tespiti
- *Legionella pneumophila*'daki moleküler epidemiyolojik farklılıkların tespiti
- Halk sağlığının korunması, olası salgınların öngörülmesi



GEREÇ VE YÖNTEM-1

Duyarlılık



Legionella pneumophila SG 1
Legionella pneumophila SG 3
Legionella pneumophila SG 6
Legionella micdadei
Legionella bozemanii

Özgüllük



Legionella türleri
Hedef dışı mikroorganizmalar
A.hydrophila, *B.subtilis*, *C.jejuni*,
E.faecalis, *E.coli*, *Klebsiella* sp,
L.monocytogenes, *S.enterica*,
S.aureus, *V.vulnificus*, *Y.enterocolitica*



GEREÇ VE YÖNTEM-2

Genomik DNA kopya sayılarının belirlenmesi



DNA'ların
konsantrasyon ve
saflık ölçümleri*

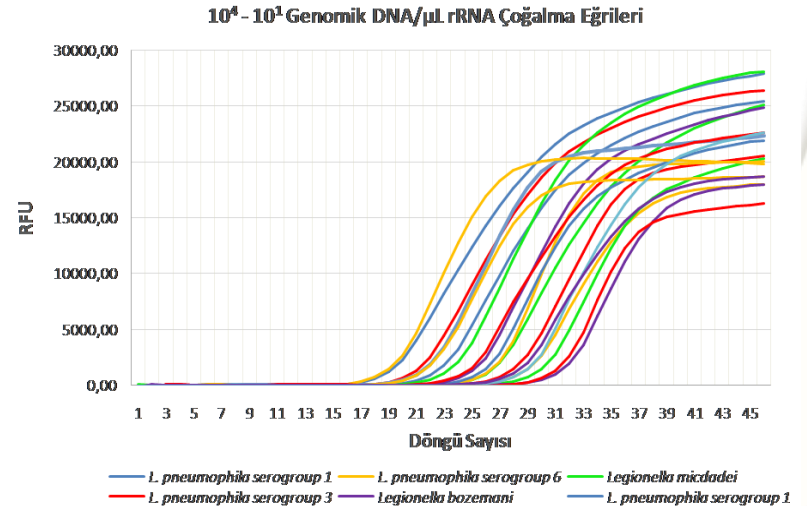


16S rRNA hedefli
qPCR**

1. İkisinin ortalamasının alınması
2. Genom kopya sayısı belirlenen stoklardan dilüsyonların hazırlanması ($10^5 - 10^1$ genomik DNA/ μ l)

*Green MR, Sambrook J, 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory,

**Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BRK, Schmidt TM, 2015; 43:D593–D598.





GEREÇ VE YÖNTEM-3: qPCR



Hedef Gen	DNA Dizisi	Ürün (bp)
ssrA	5'-GGCGACCTGGCTTC -3'	101
	5'-GGTCATCGTTTGCATTTATATTTA -3'	
	FAM-5'-ACGTGGGTTGCAA -3'-BHQ-1	
mip	5'-TTGTCTTATAGCATTGGTGCCG -3'	115
	5'-CCAATTGAGCGCCACTCATAG -3'	
	FAM-5'-CGGAAGCAATGGCTAAAGGCATGCA-3'-BHQ-1	
wzm	5'-TGCCTCTGGCTTTGCAGTTA -3'	70
	5'-CACACAGGCACAGCAGAAACA -3'	
	FAM-5'-TTTATTACTCCACTCCAGCGAT -3'-BHQ-1	

Reaksiyon karışımı

- 6 mg/ml BSA,
- 11 mg/ml betaine,
- 20 mg/ml PEG 400,
- %0.2 Tween 20,
- 20 mM Tris-HCl pH 8.0,
- 50 mM KCl,
- 1.5 mM MgCl₂,
- 0.2 mM dNTP mix,
- 1U Hot-Start Taq DNA Polymerase,
- 1 µl kalıp DNA ve
- her bir oligonükleotidten 0.5 µM içeren toplam 10 µl'lik hacim

Amplifikasyon

- 15 s 95°C (ilk döngüde 10 dk)
- 15 s 53°C
- 30 s 72°C

Collins et al . Real time PCR to supplement gold standard culture based detection of Legionella in environmental samples. Journal of Applied Microbiology 2015; 119: 1158-1169



GEREÇ VE YÖNTEM-4: HRM-MLST

Primerlerin seçimi*

qPCR

15 s 95°C (ilk döngüde 10 dk), 15 s 53°C, 30 s 72°C

HRM ile MLST analizi**



Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of
Legionella pneumophila

VERSION 5.0

**fla A, pilE, asd, mip,
momp, proA, neuA**

- **6 mg/ml BSA,**
- **11 mg/ml betaine,**
- **20 mg/ml PEG 400,**
- **%0.2 Tween 20,**
- **20 mM Tris-HCl pH 8.0,**
- **50 mM KCl,**
- **1.5 mM MgCl₂,**
- **0.2 mM dNTP mix,**
- **1U Hot-Start Taq DNA Polymerase,**
- **1 µl kalıp DNA**
- **1x Eva Green ve**
- **her bir oligonükleotidten 0.5 µM**
içeren toplam 10 µl'lik hacim

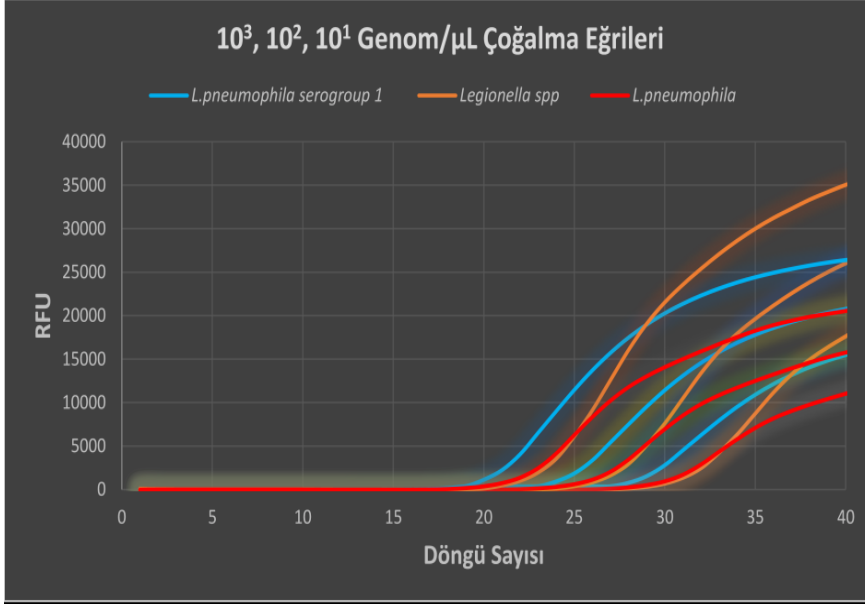
- Erime eğrileri, 65-95°C 'de 0.1°C/sn rampa hızıyla elde edildi.
- qPCR verileri CFX Manager Software 3.1'de analiz edildi.

*Mentasti M, Fry NK. 2012. *Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of Legionella pneumophila, Version 5.* ESCMID Study Group for Legionella Infections

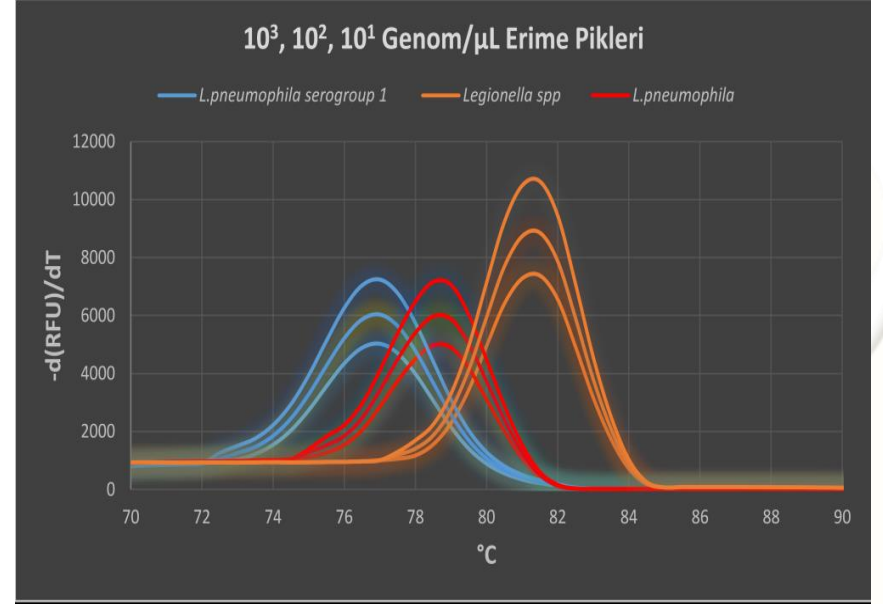
** Reja V, Kwok A, Stone G, Yang L, Missel A, Menzel C, Bassam B. *ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. Methods 2010; 50:S10-4*



BULGULAR-1



Şekil 1. Çoğalma eğrileri



Şekil 2. Erime eğrileri

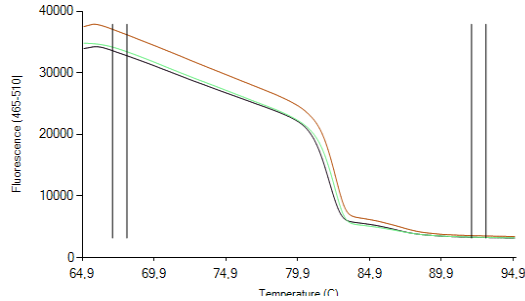
* Tüm hedefler için tespit limiti 10¹ genomik DNA/ μl



BULGULAR-2

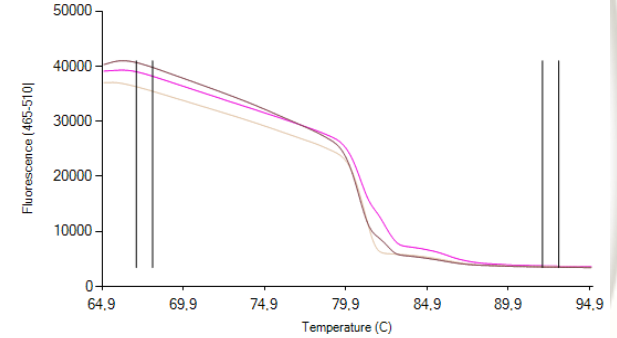
asd_Raw Data:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6



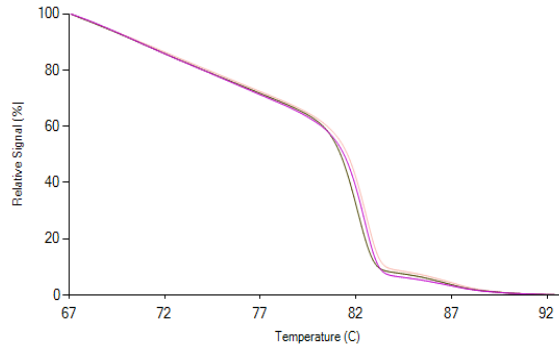
mip_Raw Data:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6



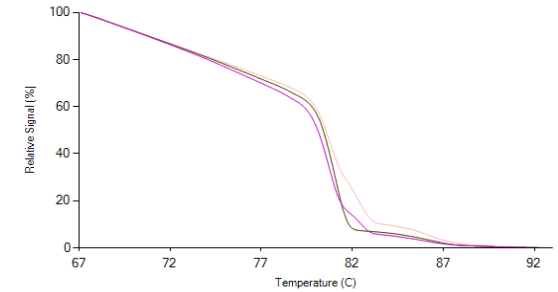
asd_Normalized Data:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6



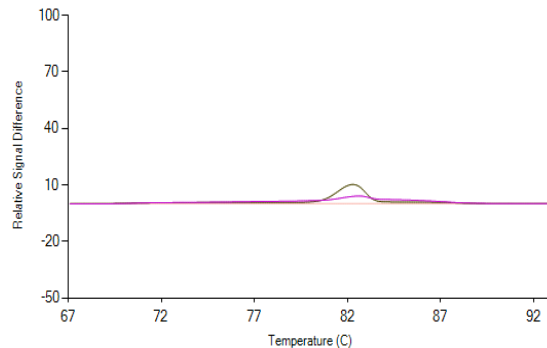
mip_Normalized Data:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6



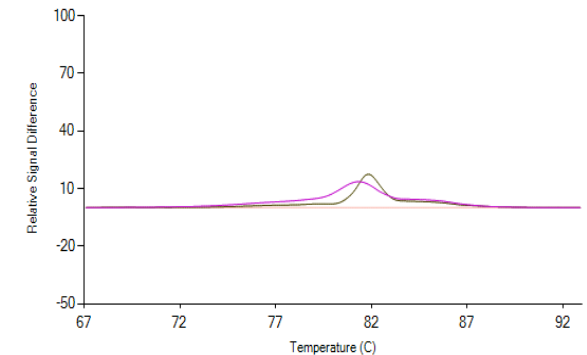
asd_Difference Graph:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6



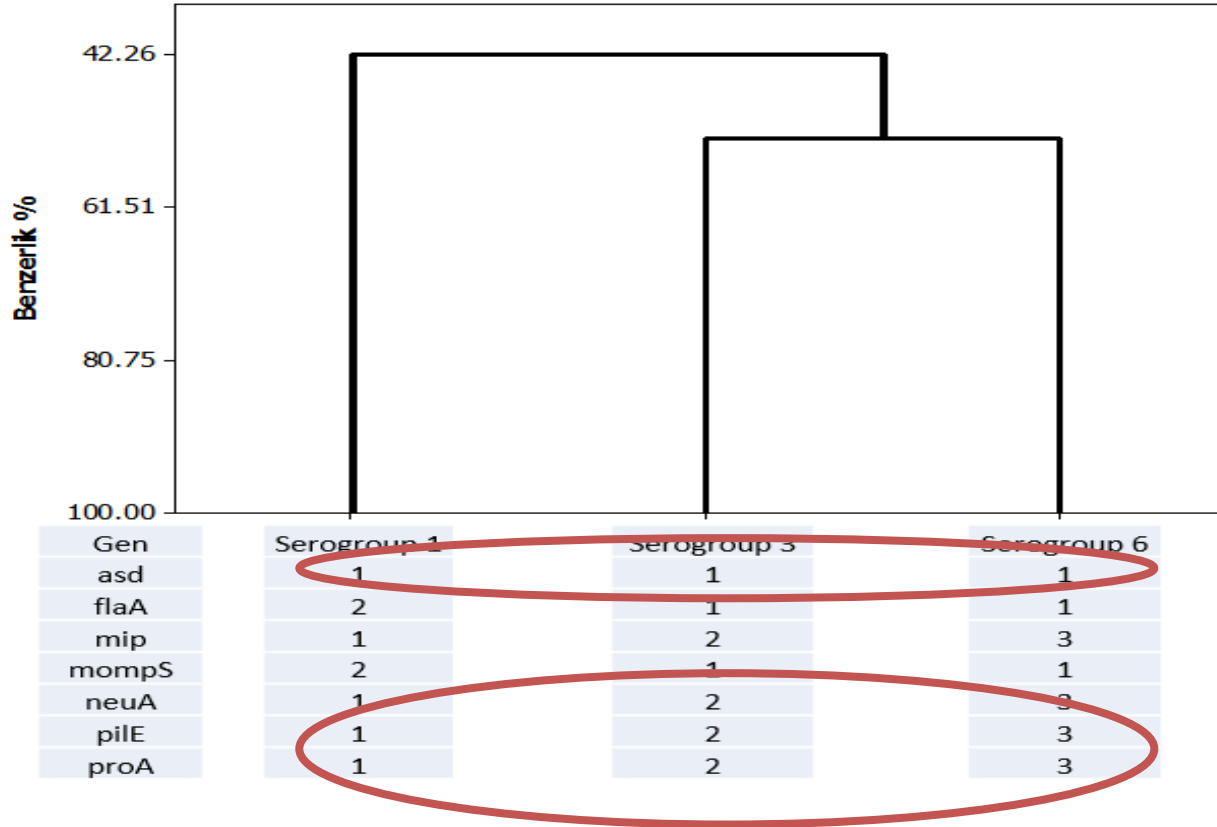
mip_Difference Graph:

Serogroup 1
Serogroup 3
Serogroup 6





BULGULAR-3



Şekil. *Legionella pneumophila* MLST profilleri benzerlik dendrogramı



BULGULAR-4

Yöntem	İşlem Süresi
Canlı ölü hücre eliminasyonu: filtrelerin DNase ile ön işlemi, guanidyum tiyosiyanat işlemi)	15 dk
DNA izolasyonu: silika kolonlar ile saflaştırma	15 dk
qPCR ile L spp, Lp, Lp SG1 tarama	90 dk
qPCR (7 hedef gen) – HRM ile MLST	160 dk



ÖZET...

Hedefler

- Çevresel örneklerde L spp, Lp, Lp SG'in saptanmasında qPCR ve kültür yönteminin karşılaştırılması
- qPCR ve/veya kültürdeki pozitiflikler için HRM-MLST uygulanması

Avantajlar

- qPCR: Çevresel örneklerde L spp, Lp, Lp SG1'in hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması,
- HRM-MLST: Moleküler epidemiyolojik farklılıkların basit, kolay uygulanabilir ve hızlı bir yöntemle tespiti

Sonuç & Yorum

- **Lejyoner Hastalığı:** Erken uyarı ve yanıt sistemini ilgilendiren çok önemli bir halk sağlığı sorununda hızla müdahale olanağı