

---

**DERLEME**

---

## **Flüoresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yönteminin Klinik Mikrobiyolojide Kullanımı**

### ***The Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Method in Clinical Microbiology***

**Gülay Börekçi**

*Mersin Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, Mersin*

---

#### **ÖZET**

*Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH), rRNA yı hedef alan probalar kullanarak kültür yöntemlerine başvurmaksızın direkt örneklerden karışık durumdaki mikroorganizmaların epiflüoresan mikroskop, konfokal lazer taramalı mikroskop veya flow sitometri ile filogenetik tanımlanmasına izin veren moleküler bir yöntemdir. Prenatal tanı, sitogenetik, biyoteknoloji, moleküler ekoloji ve tıbbi mikrobiyoloji alanlarında kullanılan FISH yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir. FISH yönteminin uygulaması kolay ve pratik, hasta başına maliyeti PCR ve konvansiyonel kültür yöntemlerine göre daha ucuz ve tanımlama süresi (yaklaşık 2-3 saat) oldukça kısadır. Bu derlemede mikroorganizmaların hızlı tanımlanmasına olanak sağlayan klasik FISH yöntemi (prensip, avantaj ve dezavantajları) ve klinik mikrobiyolojideki kullanımından bahsedilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** FISH, mikrobiyoloji, tanımlama

#### **SUMMARY**

*The fluorescence in situ hybridization (FISH) which is a molecular method that allows phylogenetic identification of microorganisms in mixed assemblages from direct samples without prior cultivation, is based on the use of rRNA-targeted probes and works by means of epifluorescence, confocal laser scanning microscopy or flow cytometry. The sensitivity and specificity of FISH method are very high in prenatal diagnosis, cytogenetics, biotechnology, molecular ecology and medical microbiology. The application of FISH method is easy and practical, the cost per patient is less than PCR and conventional culture methods and the identification time is shorter (approximately 2 and 3 hours). This review is focused on classical FISH method that is applied for the rapid identification of microorganisms and its use (principle, method, advantage and disadvantages) in clinical microbiology.*

**Key Words:** FISH, microbiology, identification

## GİRİŞ

Son yıllarda, çeşitli örneklerdeki mikroorganizmaların tanımlanmasında kültür yöntemlerine başvurmadan moleküler tekniklere dayalı yöntemlerin kullanılması geniş uygulama alanı bulmuştur. Moleküler yöntemler, bilimin birçok alanında olduğu gibi enfeksiyon hastalıklarının erken tanısı, mikroorganizmaların tür ve alt tür düzeyinde ayrımlarının yapılması, antibiyotiklere direncin saptanması, virülans genlerinin araştırılması, epidemilerin belirlenmesi ve izlenmesi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kültür gibi klasik yöntemler "altın standart" olarak önemini eskisi gibi korumakla birlikte, birçok enfeksiyon etkeninin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Çoklu dirençli mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda, etken mikroorganizmanın hızla belirlenip, antibiyotiklere duyarlılığın saptanarak tedavinin erken dönemde başlaması hayati önem taşımakta; ancak klasik yöntemlerle bu süreç uzun zaman almaktadır. Moleküler yöntemler bu süreci kısaltmakta ve ayrıca *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* ve *Chlamydia trachomatis* gibi özellikle kültürlerde üremeyen, üretilmesi güç ve geç olan mikroorganizmaların tanımlanmasında da önem taşımaktadır (1-3).

Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi, rRNA'yı hedef alan flüoresan işaretli prob lar ile hedefin işaretlenmesi ve flüoresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan moleküler bir yöntemdir. FISH yöntemi ile kültür ve fenotipik özelliklerin belirlenmesine gerek kalmadan mikroorganizmaların kısa sürede tanısı yapılabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan bu yöntemin ucuz, pratik ve kolay olması ve yaklaşık 2-2.5 saat gibi kısa sürede tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlaması yönünden avantajları bulunmaktadır (4-6).

FISH yöntemi, tıbbi genetik, biyoteknoloji ve moleküler ekoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Onkoloji ve prenatal tanıda, hasta başına maliyetinin yüksek olması ve tanı süresinin daha uzun olmasına rağmen rutinde tercih edilen bir yöntemdir (6,7-11). Mikrobiyoloji alanında ise kullanılan problemlerin ucuz olması, tanımlama süresinin kısa olması, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, yöntemin kolay olması, pahalı alet ve cihazlar gerektirmemesi gibi avantajları bulunmasına rağmen ülkemizde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş yer bulamamıştır (3,4,6).

## FISH YÖNTEMİNİN MİKROBİYOLOJİDE KULLANIM ALANI

Direkt klinik örneklerden veya kültürlerdeki üremelerden aile, cins ve tür düzeyinde mikroorganizmaların hızlı tanımlanmasında ve mikroorganizmaların filogenetik analizlerinde kullanım alanı bulmuştur (9,12,13).

## FISH YÖNTEMİNİN PRENSİBİ

FISH yöntemi rRNA'yı hedef alan problemler kullanarak kültür yöntemlerine başvurmaksızın direkt klinik örneklerden karışık ortamdaki mikroorganizmaların epiflüoresan mikroskop, konfokal lazer taramalı mikroskop (Confocal laser scanning microscopy; CLSM) veya flow sitometri ile filogenetik tanımlanmasına izin verir. FISH yöntemi örneklerin fikse edilmesinden sonra (Etanol/paraformaldehid: ETOH/PFA) rRNA'yı hedef alan flüoresan işaretli prob kullanılarak, prob ile hedef genin hibridize olması ve hibridizasyondan sonra flüoresan mikroskopunda parlak ışık saçan mikroorganizmaların görüntülenmesi esasına dayanır (3,4,9,12).

## FISH YÖNTEMİNDE AŞAMALAR

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan FISH yöntemi fiksasyon, preparatların hazırlanması ve dehidratasyon, hibridizasyon, yıkama ve görüntüleme aşamalardan oluşmaktadır.

### Fiksasyon aşaması

Mikroorganizmaların çoğu aldehytler (formalin, paraformaldehid [PFA], gluteraldehid) ve alkoller (metanol, etanol) ile fikse edilerek oligonükleotid ve polinükleotid problemler için geçirgen hale getirilirler. Fiksasyon hücrelerin morfolojisini korumak, nükleik asit kaybını önlemek ve probun hücre içine girişini kolaylaştırmak için yapılmaktadır. Standart fiksasyon solüsyonu olarak %4'lük PFA kullanılmaktadır. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler için fiksasyon protokolü farklılık göstermektedir. Gram negatif bakterilere %4'lük PFA yeterliyken, gram pozitif bakterilerde lizozim, lizostafin veya proteinaz K ile fiksasyon sonrası işlemlere gereksinim duyulmaktadır (4,5,14).

### Preparatların hazırlanması ve dehidratasyon aşaması

Bu aşama, fikse edilmiş örneklerin teflon lam üzerindeki kuyucuklara belirli miktarlarda (genellikle 1-10 µl) ilave edilmesini, preparatların kurutulmasını ve dehidratasyonu kapsar. Fiksasyon ile morfolojisi korunan ve nükleik asit kaybı önlenen hücrelere prob girişini kolaylaştırmak için preparatlar, %50, %80 veya %96'luk etil alkolde üçer dakika bekletilerek dehidrate edilirler (4,15).

### Hibridizasyon aşaması

Hibridizasyona başlamadan önce mikroorganizmaların cins ve tür düzeyinde tanımlanmasını yapmak için uygun problemlerin seçilmesi gerekir. Hedef DNA/RNA molekülüne komplementer olarak işaretli nükleik asitin, yani probun kullanılması bu yöntemin en önemli aşamasıdır. Hibridizasyonun güvenilir ve duyarlı olmasında

kullanılan probun amaca yönelik olması, uzunluğu, kalitesi, hedef bölgeye özgünlüğü büyük önem taşımaktadır.

1- FISH yönteminde kullanılan problemler: FISH yönteminde rRNA molekülleri nükleik asit problemleri için ideal hedeflerdir. rRNA'nın filogenetik marker olarak kullanılması ve aktif üreyen her hücrede yaklaşık 1200 kopya bulunması dolayısıyla hedef olarak kullanılan en uygun moleküldür (13). Prokaryotlarda 16S rRNA veya 23S rRNA, ökaryotlarda ise 18S rRNA genellikle hedef molekül olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA kültür yapılmaksızın tıbbi ve çevre örneklerinden rRNA dizilerinin elde edilmesinde ve mikroorganizmaların filogenetik analizlerinde günümüzde en yaygın kullanılan moleküldür (16). FISH yönteminde günümüzde kullanılan prob çeşitleri aşağıda açıklanmıştır.

a- *Oligonükleotid problemler:* Oligonükleotidler ideal hibridizasyon problemleridir ve FISH tekniğinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. rRNA'yı hedef alan oligonükleotid problemler kimyasal olarak sentez edilen, tek sarmallı, kısa (genellikle 15-25 nükleotid uzunluğunda) DNA molekülleri olup, ticari olarak kolaylıkla satın alınabilen en ucuz problemlerdir (13,16).

b- *Polinükleotid problemler:* Oligonükleotid problemlere alternatif olarak kullanılan polinükleotid problemler FISH tekniğinin geliştirilmesi amacıyla kullanıma girmiştir. Polinükleotid problemler oligonükleotid problemlere göre 26 kez daha fazla flüoresans verirler. Bu problemler düşük ribozom içeriği olan ve zayıf sinyal oluşturan hücreler için önerilmektedir. Polinükleotid problemler ticari olarak satılmamakta ve araştırmacılar tarafından laboratuvarında sentez edilmektedir. Polinükleotid problemler polynucleotide (Poly)-FISH ve RING (Recognition of Individual Genes)-FISH gibi yeni FISH tekniklerinde kullanılmaktadır. Polinükleotid problemler Euryarchaeota, Bacteria gibi uzak taksonları ayırt etmek için kolaylıkla

kullanılabilir, ancak bakterileri tür ve cins düzeyinde ayırt etmek için kullanımları zordur. Ayrıca oligonükleotid problemlere göre enzimlere daha hassastırlar, kolaylıkla bozulabilirler (17-19).

c- *Peptid nükleik asit (PNA) ve locked nükleik asit (LNA) problemler*: PNA ve LNA problemler FISH yöntemini geliştirmek için son yıllarda kullanılan yeni problemlerdir. PNA ve LNA problemlerin her ikisi de komplementer nükleik asitlere yüksek affinite gösterirler. PNA problemler standart oligonükleotid problemlerin bir modifikasyonudur ve DNA veya RNA'ya hibridize olabilen sentetik DNA polimeridir. LNA ise RNA türevidir ve riboz halkası 4' karbon ve 2' oksijen arasındaki metilen bağı ile C3' iç yapısına eklenmiştir. Her ikisi de yüksek affinitelerinden dolayı hedef olmayan hücrelere bağlanmazlar. Ancak LNA ve PNA problemlerin en önemli dezavantajı maliyetinin yüksek olmasıdır (19).

d- *Diğer problemler*: FISH yönteminde bunlardan başka plazmidler ile genomik DNA'yı hedef alan problemler, helper problemler ve tek hedef organizma için çoklu problemler de kullanılmaktadır (9).

2- Problemlerin seçimi, işaretlenmesi ve saklanması: FISH uygulamalarında daha önceden aile, cins ve tür düzeyinde tanımlanmış ve yayınlanmış problemlerin kullanılması büyük kolaylık sağlar. FISH için kullanılan problemlerin listesi <http://www.microbial-ecology.net/probebase/default.asp?mode=search> internet sitesinden elde edilebilir (20). Bakteriler (Bacteria), arkebakteriler (Archaea), ve ökaryotları (Eukarya) kapsayan listeden prob sentezinde ve çalışmada kullanılacak bilgileri elde etmek mümkündür (Prob ismi, hedef organizma, hedef molekül, gen dizisi, formamid konsantrasyonu, referans vs.). Problemlerin özgüllüğü çeşitli veri tabanları (16S/18S rRNA-SILVA, 23S/28S rRNA-SILVA, 16S rRNA-RDP II gibi) ile kontrol edilebilir (21, 22).

FISH uygulamalarında oligonükleotidler flüoresan boyalar, biotin, digoxigenin veya enzimlerle işaretlenirler. Mikroorganizmaların cins veya tür düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlayan hedef dizi belirlendikten sonra, işaretlenmesi istenilen flüoresan boya veya enzim seçilerek problemler ticari olarak çeşitli firmalara sentez ettirilebilir (Microsynth, Switzerland; Biomers, Germany; vb.) veya hazır kit olarak satın alınabilirler (Izinta, Hungary; AdvanDx, Denmark /USA). Ancak hazır kitler klasik FISH yöntemine göre daha pahalıdır. İşaretlemede kullanılan flüoresan boyaların mikroskopta bulunan filtrelerle uyumlu olması gerekir (4,23-26).

Liyofilize olarak sentez ettirilen problemler steril distile su ile sulandırıldıktan sonra stok veya çalışma solüsyon olmak üzere iki şekilde saklanabilirler. Stok hazırlanan problemler küçük porsiyonlar şeklinde; çalışma solüsyonları da Cy3 ve Cy5 için 30 ng, flüoresan boyalar içinde 50 ng prob olacak şekilde hazırlanarak -20°C de saklanırlar. Hibridizasyonda her örnek için çalışma solüsyonundan 1 µl tür veya cinse özgü prob + 9 µl hibridizasyon solüsyonu olarak uygulanır (15). Tablo 1'de FISH yöntemi ile tanımlanabilen bazı mikroorganizmalar ve problemler için örnekler verilmiştir.

Hibridizasyonda 15-20 nükleotid uzunluğundaki flüoresan işaretli prob ile hedef organizma uygun NaCl ve formamid konsantrasyonu içeren solüsyon ile bir araya getirilerek hibrid oluşturulur. Probun özgüllüğü, örnekteki bakterinin permeabilizasyonu, hibridizasyon ısısı hibridizasyonu etkileyen faktörlerdir. Uygun konsantrasyonda (50 ng veya 30ng) hazırlanan belirli miktardaki prob ile hibridizasyon solüsyonun (5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 8.0, %10 SDS, formamid, dH<sub>2</sub>O) (1 µl prob + 9 µl hibridizasyon tamponu) belirli ısı derecesinde (genellikle 46°C) nemli bir ortamda 1-1.5 saat enkübe edilmesiyle

**Tablo1.** FISH yöntemi ile tanımlanabilen bazı mikroorganizmalar ve probalar için örnekler

Prob kısa ismi	Prob cinsi	Hedef molekül (rRNA)	Hedef mikroorganizma	Hedef dizi (5'-3')	Kaynak
EUB338	Oligo	16S	Pek çok bakteri	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	27
UNIV1390	Oligo	16S	Tüm organizmalar	GAC GGG CGG TGT GTA CAA	28
ACA652	Oligo	16S	<i>Acinetobacter</i>	ATC CTC TCC CAT ACT CTA	29
ALBO34a	Oligo	23S	<i>Acinetobacter Bordetella spp.</i>	CGT GCC TTC AAC CTG GCC	30
Alc-476	Oligo	16S	<i>Alcaligenes faecalis</i>	CTG CAG ATA CCG TCA GCA GT	31
Burkho	Oligo	16S	<i>Burkholderia spp.</i>	ACC CTC TGT TCC GAC CAT	32
Burcep	Oligo	16S	<i>Burkholderia cepacia</i>	CTG TGC GCC GGT TCT CTT	32
AERO1244	Oligo	16S	<i>Aeromonadaceae</i>	GCT TGC AGC CCT CTG TAC GCG	33
LEG226	Oligo	16S	<i>Legionellaceae</i>	TCG GAC GCA GGC TAA TCT	34
LEGPNE1	Oligo	16S	<i>Legionella pneumophila</i>	ATC TGA CCG TCC CAG GTT	35
Chis150	Oligo	16S	<i>Clostridium histolyticum grup</i>	TTA TGC GGT ATT AAT CTY CCT TT	36
Chla-0232	Oligo	16S	<i>Chlamydia</i>	TAG CTG ATA TCA CAT AGA	37
Cn-0974	Oligo	16S	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AAG TCC AGG TAA GGT CCT C-AAA CCC AGG TAA GGT CCT	37
Ct-0623	Oligo	16S	<i>Chlamydia trachomatis</i>	ATT AGA TGC CGA CTC GGG	37
EBAC1790	Oligo	23S	<i>Enterobacteriaceae</i>	CGT GTT TGC ACA GTG CTG C- CGT GTT TGC AGA GTG CTG	38
ECO1167	Oligo	23S	<i>Escherichia coli</i>	GCA TAA GCG TCG CTG CCG	39
Kpn	Oligo	23S	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCT ACA CAC CAG CGT GCC	5
Pae997	Oligo	16S	<i>Pseudomonas spp</i>	TCT GGA AAG TTC TCA GCA	40
PseaeA	Oligo	23S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TCT CGG CCT TGA AAC CCC	32
Sta	Oligo	16S	<i>Staphylococcus spp.</i>	TCT CGG CCT TGA AAC CCC	5
Sau	Oligo	16S	<i>Staphylococcus aureus</i>	GAA GCA AGC TTC TCG TCC G	5
Str	Oligo	16S	<i>Streptococcus spp.</i>	TCC TCC ATA TCT CTG CGC	41
Spn	Oligo	16S	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GTG ATG CAA GTG CAC CTT	5
Saga	Oligo	16S	<i>Streptococcus agalactiae</i>	GTA AAC ACC AAA CMT CAG CG	41
Spy	Oligo	16S	<i>Streptococcus pyogenes</i>	TTC CAA AGC GTA CAT TGG TT	41
Enc	Oligo	16S	<i>Enterococcus spp.</i>	CCC TCT GAT GGG TAG GTT	5
Efs	Oligo	16S	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCC CTT CTG ATG GGC AGG	6
Haeinf	Oligo	16S	<i>Haemophilus influenzae</i>	CCG CAC TTT CAT CTT CCG	32
ClaWT	Oligo	23S	Klaritromisine duyarlı <i>Helicobacter pylori</i>	CGG GGT CTT TCC GTC TT	42
ClaR3	Oligo	23S	Klaritromisine dirençli <i>Helicobacter pylori</i>	CGG GGT CTT GCC GTC TT	42
Catherm	Oligo	23S	<i>Termotolerant Campylobacter spp.</i>	GCC CTA AGC GTC CTT CCA	43
Cajej	Oligo	23S	<i>Campylobacter jejuni</i>	AGC TAA CCA CAC CTT ATA CCG	43
PF2	Oligo	18S	Tüm mayalar	CTC TGG CTT CAC CCT ATT C	5
Caal	Oligo	18S	<i>Candida albicans</i>	GCC AAG GCT TAT ACT CGC T	5
Cagl	Oligo	18S	<i>Candida glabrata</i>	CCG CCA AGC CAC AAG GAC T	5
Capara651	Oligo	18S	<i>Candida parapsilosis</i>	CCT GGT TCG CCA AAA AGG C	5
Ckrus	Oligo	18S	<i>Candida krusei</i>	GAT TCT CGG CCC CAT GGG	5
-	PNA	16S	<i>Candida dubliniensis</i>	TAGCCAGAAGAAAGG	44
Giar-4	Oligo	16S	<i>Giardia intestinalis</i>	CGG CGG GGG GCC AAC	45
Giar-6	Oligo	16S	<i>Giardia intestinalis</i>	CGG GGC TGC CGC GGC GCG	45
CRY-1	Oligo	18S	<i>Cryptosporidium</i>	CGG TTA TCC ATG TAA GTA AAG	46
-	Oligo	16S	<i>Pneumocystis carini</i>	TTCGGAGGACCAGGCAACCAATCCCT	47
Bru-996	Oligo	16S	<i>Brucella spp.</i>	CCA CTA ACC GCG ACCGGG ATG	48
MTC	PNA	16S	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks	NH2-CTT AGG AAT-TTT CGG-Lys-Flu-H	49
NTM	PNA	16S	Non tuberculosis <i>Mycobacteria</i>	NH2-CGG TCG CCC ATT ACG-Ala-Ala-Flu-H	49
-	Oligo	16S	<i>Mycobacterium leprae</i>	CATCCTGCACCGCAAAAAGCTT	50

hedef organizma ile cDNA'nın (tek iplikli probun) hibridizasyonu sağlanır. Hibridizasyon solüsyonu içindeki kimyasal maddeler (NaCl, TRIS, SDS, formamid) uygun ısı derecesinde bazların doğru eşleşmesini kolaylaştırır. Ortamda bulunan formamid düşük ısıda hibridizasyonu sağlar. Hibridizasyonun sıkılığı (stringency) ısı ile ayarlanabilir. Hibridizasyon ısısı oligonükleotidlerin çözülme ısısına (dissociation temperature, Td) bağlıdır ve bu deneysel olarak optimize edilebilir. 15-25 arası nukleotid uzunluğundaki problemler için hibridizasyon ısısı 37-55°C arasında değişir. Yüksek ısı fikse edilen hücrelere zarar verebilir. Hibridizasyonda en sık kullanılan ısı derecesi 46°C'dir (4,15,51). Tablo 2'de formamid konsantrasyonuna (%) göre hazırlanan hibridizasyon tampon solüsyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir (15).

#### Yıkama aşaması

Hedef diziye bağlanmamış veya non-spesifik bağlanmış problemlerin ortamdan uzaklaştırılması için uygulanır. Yıkama işlemi preparatların yıkama solüsyonu (TRIS HCl, %10 SDS, 0.5 M EDTA, 5M NaCl, Distile su) içerisinde belirli ısı derecesinde (genellikle su banyosunda 48°C)

10-20 dakika uygulanmasını kapsar. Tablo 3'de formamid konsantrasyonuna göre hazırlanan yıkama solüsyonundaki kimyasallar ve miktarları verilmiştir. Yıkama işleminden sonra preparatlar distile su ile yıkanır ve havada kurutulur. Bu aşamadan sonra her bir kuyucuğa %0.001'lik DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)'den 10 µl eklenerek, 7-10 dakika karanlıkta bekletilir ve sonra preparatlar distile su ile yıkanır, havada kurutulur (4, 15, 52). DAPI DNA'ya bağlanan flüoresan bir boyadır ve hem canlı hem de fikse örnekleri boyamada kullanılır. DAPI ile boyama sonucu örnekte bulunan toplam hücre sayısı (bakteri/mantar) belirlenebilmektedir (13).

#### Görüntüleme aşaması

Yıkama işleminden sonra havada kurutulan preparatların üzerindeki kuyucuklara özel bir solüsyon (citifluor veya antifade solüsyon) damlatılarak (genellikle 1-5 µl) lamel kapatılır ve flüoresan mikroskopta incelenir. Citifluor veya antifade solüsyon kullanılan flüoresan boyaların solmasını önlemek için kullanılmaktadır (4,15). Görüntüleme için işaretlemeye kullanılan flüoresan boyaya uygun filtre seçilmesi gerekir.

**Tablo 2.** Hibridizasyon tamponu için formamid konsantrasyonuna göre hazırlanan kimyasallar ve miktarları

Solüsyonlar	Formamid Konsantrasyonu (%)												
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70
5M NaCl (µl)	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360
1M Tris/HCl (µl)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Formamid (µl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1300
Steril distile su (µl)	1600	1500	1400	1300	1200	1100	1000	900	800	700	600	500	300
%10 SDS (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Tablo 3.** Yıkama solüsyonu için formamid konsantrasyonuna göre hazırlanan kimyasallar ve miktarları

Solüsyonlar	Formamid Konsantrasyonu (%)												
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70
0.5M EDTA (µl)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
1M Tris/HCl (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
5M NaCl (µl)	9000	6300	4500	3180	2150	1490	1020	700	460	180	100	40	0
Steril distile su (ml)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
%10 SDS (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tek prob kullanılması durumunda tekli filtreler, birden fazla farklı flüoresanla işaretlenmiş problemlerin kullanılması durumunda ise ikili (dual filter set) veya üçlü (triple filter set) filtreler kullanılarak elde edilen görüntüler analiz sistemlerince özel bir software ve bilgisayar yardımıyla kayıt edilebilir (4,13).

## FISH YÖNTEMİNDE KULLANILAN FLOROFOR MİKROSKOP ve FİLTRELER

FISH yönteminde rRNA'yı hedef alan problemler radyoaktif izotoplarla işaretlenebildiği gibi, radyoaktif olmayan özel flüoresan boyalarla da işaretlenebilirler. Ancak radyoaktif elementlerin yarı ömrünün kısa olması ve sağlığa zararlı etkilerinden dolayı daha çok FISH uygulamalarında non-radyoaktif elementler kullanılmaktadır (13,16). Günümüzde en çok kullanılan boyalar flüorofor (fluorophore) olarak isimlendirilen boyalardır. Fluorescein isothiocyanate (FITC) en yaygın kullanılan flüoroforlardan biridir. Cyanine (CY)'lerden CY3, CY5 ise duyarlılık seviyelerinin yüksek olması ve flüoresan özelliklerini uzun süre koruma kapasiteleri nedeniyle tercih edilen flüoroforlardır (13). CY boylarına alternatif Alexa Fluor ve DyLight gibi yeni jenerasyon flüoroforlar ise genellikle ışığa karşı daha stabil, daha parlak ve pH sensitivitesi daha az olan boyalardır, ancak diğer boyalara göre

daha pahalıdırlar (53,54). Bazı FISH uygulamalarında ise problemler alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi enzimlerle işaretlenmektedir (55). Tablo 4'de FISH tekniğinde kullanılan işaretleyiciler verilmiştir.

Tablo 5'de bazı floroforlar ve özellikleri verilmiştir (15,56). Tabloda floroforlar için absorpsiyon ve emisyon dalga boyları Zeiss (Germany) marka mikroskop için verilmiştir. Florofor rengi ve absorpsiyon ve emisyon dalga boyu mikroskoplara göre farklılık gösterebilmektedir.

FISH yönteminde kullanılan florofor maddeler aracılığıyla sinyalin görüntülenmesi için epiflüoresan mikroskop, flow sitometri veya konfokal lazer taramalı mikroskoptan yararlanılmaktadır (4,9,12,57). Epiflüoresan mikroskopta görüntü alabilmek için kullanılan flüoresan boyalara uygun filtrelerin bulunması gereklidir. DAPI, FITC ve TRICH en sık kullanılan filtrelerdir. Seçilen flüoresan boyalara göre filtreler tekli (DAPI, FITC, TRICH), ikili DAPI+FITC veya TRICH+FITC ve üçlü setler (DAPI+FITC+TRICH veya DAPI+FITC+Texas-red) şeklinde kullanılabilir. Birden fazla farklı florofor ile işaretli prob kullanarak eş zamanlı görüntüler elde edilebilir (58). Ancak amaca uygun prob ve filtrelerin doğru seçimi oldukça önemlidir, aksi halde hatalı sonuçlar alınabilir.

Günümüzde görüntü analiz sistemlerinin kullanıma girmesiyle özel yazılım programları ve bilgisayar aracılığıyla görüntülerin daha net olarak alınması ve kaydedilmesi sağlanmaktadır. Son yıllarda konfokal lazer taramalı mikroskopun geliştirilmesiyle FISH yönteminde karşılaşılan önemli sorunlardan biri olan otoflüoresan olayı çözümlenmiştir. Konfokal lazer taramalı mikroskop; yüksek lazer parlaklığı, uzaysal düzenliliği, minimum ışın sapma özelliği, düşük gürültü ve minimum dalgalanma özellikleri nedeniyle de yüksek çözünürlük sağlamakta ve el-

**Tablo 4.** FISH tekniğinde kullanılan işaretleyiciler

<b>1. Radyoaktif elementler</b>
<b>2. Non-radyoaktif elementler</b>
<b>a. Flüoresan boyalar</b>
Fluorescein
Tetramethylrhodamine
Texas red
CY3, CY5
<b>b. Non-flüoresan işaretleyiciler</b>
Biotin
Digoxigenin
Enzimler (Alkaline phosphatase, horse-radish peroxidase)

**Tablo 5.** FISH yönteminde sık kullanılan bazı flüoresan boya ların özellikleri

Flüoresan boya	Max. eksitasyon (nm)	Max. emisyon (nm)	Renk
5-Fluorescein (FITC)	495	520	Yeşil
5-Carboxyfluorescein (FAM)	495	520	Yeşil
6-Carboxyfluorescein (FAM)	495	520	Yeşil
Alexa Fluor 488	495	519	Yeşil
5(6)-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)	546	576	Sarı-turuncu
6-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)	544	576	Sarı-turuncu
Texas Red-X	583	603	Turuncu
Alexa Fluor 568	578	603	Turuncu
Alexa Fluor 430	434	541	Sarı
Cy3	552	570	Sarı
AMCA-X (Coumarin)	353	442	Mavi
DAPI	359	461	Mavi
Cy5	643	667	Kırmızı
Cy5.5	675	694	Kırmızı
Alexa Fluor 633	632	647	Kırmızı
TRICH	550	580	Kırmızı-turuncu

de edilen görüntü konvansiyonel flüoresan ışık mikroskoplarına kıyasla çok daha net olmaktadır. Odak alanı içindeki ışık geçirildiğinden sadece görüntü alanı netleşmekte ve odak dışı yansıyan ışık görüntülenmemektedir. Konfokal lazer taramalı mikroskop hücrelerin bütünlüğü bozulmadan seri kesitler alabilme özelliği sayesinde canlı hücrelerle çalışırken de büyük olanaklar sağlamakta, özellikle kalın kesitlerden kaliteli görüntüler elde edilebilmektedir. Konfokal lazer taramalı mikroskopun son yıllarda çok popüler hale gelmesine neden olan diğer özelliği ise 3 boyutlu görüntü sağlamasıdır (3, 59).

### FISH YÖNTEMİNİN AVANTAJLARI

Karışık ortamdaki mikroorganizmaların doğal ortamlarında identifikasyonuna izin verir. Kültür yapılmasına gerek kalmadan mikroorganizmaların tür düzeyinde identifikasyonunu sağlar. Kültürü yapılamayan veya yavaş üreyen mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlar.

Miks enfeksiyonların tanımlanmasında diğer yöntemlere göre üstünlükleri vardır. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Yöntemin tüm aşamaları oda ısısında yapılmaktadır. Örneklerin saflaştırılmasına gerek yoktur. Uygulanması kolay, basit ve ucuz bir yöntemdir. İdentifikasyon süresi kısadır. Manual yöntemin dışında kit ile çalışmak mümkündür (5,6,12,25,35,36).

### FISH YÖNTEMİNİN DEZAVANTAJLARI

#### Oto-flüoresans nedeniyle gerçek pozitifliğin saptanamaması

Siyanobakteriler ve mayalar gibi bazı mikroorganizmaların kendileri otoflüoresans verirler. Ayrıca ortamda bulunan artefaktlar ve boya kalıntıları da gerçek pozitifliğin ayırımında sorun yaratabilir. FISH çalışmalarında pozitif (Eub338) ve negatif kontroller (Non-Eub338) ile prob kullanılmadan sadece hibridizasyon solüsyonu ile muamele edilmiş örneklerin çalışılması da otoflüoresans sorununu çözmede yardımcı ola-



bilir. Ancak tüm bakterileri kapsayan ve pozitif kontrol olarak kullanılan Eub338 bazı bakterileri içermeyebilir. Bu durumda ise komplementer problemler (Eub338-II, Eub338-III gibi,) tercih edilmelidir. Bundan başka otoflüoresans sorunu konfokal lazer taramalı mikroskop kullanımıyla da giderilebilir (3,13,19).

#### **Hücre ve sinyal olmaması**

FISH yöntemindeki önemli problemlerden biri de örnekte hücre ve sinyalin görülmemesidir. FISH yönteminin örnekteki hücreleri belirleme sınırı  $10^3$  CFU/ml'dir. Dolayısıyla örnekte az sayıda bulunan mikroorganizmaların tanımlanması zor olabilir ve buna bağlı olarak hücre ve sinyal görülmeyebilir. Örnekteki hücre konsantrasyonu düşük olduğunda örnekler santrifuj edilerek veya membran filtrasyon ile konsantre edilerek çalışılabilir (15).

#### **Düşük sinyal oluşumu**

FISH yönteminin diğer önemli dezavantajlarından biride düşük sinyal yoğunluğudur. Düşük sinyal iki nedenle olabilir. Birincisi probun hücre içine girişini önleyen hücrenin permeabilitesi yetersiz olabilir. Bu durum çeşitli kimyasal maddeler ve enzimler (lizozim, proteinaz K, lizostafin) kullanılarak, probun hücre içine girişi kolaylaştırılarak çözümlenebilir. Ancak hücre kaybına karşı dengiyi iyi ayarlamak gerekmektedir. Klasik FISH yönteminde zayıf sinyal oluşumunun ikinci esas nedeni hedef organizmada düşük rRNA içeriğidir ki düşük ribozom içeriği örnekte metabolik olarak inaktif hücreler veya yavaş üreyen hücrelerde oluşmaktadır. Klasik FISH yöntemindeki bu sorunlar nedeniyle bu yöntemin duyarlılığını artırmak için yeni yaklaşımlar ve yöntemler geliştirilmektedir (9,12).

#### **Probların sınırlılığı**

Bazı problemlerin aile ve cins düzeyinde tanımlama olarak sağlanmasına rağmen tüm bakte-

riler için tür düzeyinde tanımlayacak problemlerin olmaması ve bazı problemlerin spesifitesinin yetersiz olması yeni problemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır (19).

#### **SONUÇ**

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların identifikasyonu ve tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel kültür yöntemleri ile identifikasyon süresi uzun olmakta ve bazı türler ile mikts infeksiyonların tanımlanmasında bu yöntem yetersiz kalmaktadır. PCR yöntemlerinin ise rutinde kullanılabilmesi için hala sorunlar bulunmaktadır. FISH yöntemi ile kültür yöntemlerine gerek duyulmadan direk klinik örneklerden kısa sürede mikroorganizmaların tür düzeyinde identifikasyonu yapılabilmektedir. Uygulaması kolay, diğer yöntemlere göre ucuz ve duyarlılığı yüksek olan bu yöntem özellikle sepsis, menenjit gibi hayati önem taşıyan enfeksiyon hastalıklarının erken tanı ve tedavisine olanak tanıyarak mortalite ve morbiditenin azalmasına katkı sağlayabilir. Son yıllarda klasik FISH yöntemindeki sıkıntılar araştırmacıları bu yöntemin duyarlılığını geliştirmeye yönelik yeni tekniklerin arayışlarına yöneltmiştir. Tıbbi genetik, moleküler ekoloji ve tıbbi mikrobiyoloji alanlarında kullanılmak üzere PNA FISH, LNA-FISH, RNA-FISH, RING FISH, POLY-FISH, CARD-FISH, MICRO-CARD-FISH, ACM-FISH, catFISH, COBRA-FISH, COD-FISH, COMBO-FISH, Comet-FISH, Fiber-FISH, Q-FISH, Raman-FISH, SIMS-FISH, FISH-MAR gibi pek çok yeni FISH teknikleri geliştirilmiştir (12). Yakın bir gelecekte ileri FISH teknikleri ile birlikte bu yöntem rutin kullanımında büyük kolaylık sağlayarak ülkemizde de klinik mikrobiyoloji laboratuvarındaki yerini alacaktır.

**İletişim / Correspondence**

Gülay Börekçi  
 Mersin Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu  
 Yenişehir kampüsü, 33169, Mersin  
 Tel: 0324 341 2815  
 0532 722 6712  
 e-mail: gulay\_borekci@yahoo.com

**Kaynaklar**

- Kocagöz S. Bakterilerde antibiyotik direncinin moleküler tanı yöntemleri ile saptanması. In: Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S, eds. İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No 42: İstanbul, 2002:1-4.
- Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyon yönteminin bakteriyolojide kullanımı. In: Durmaz R, ed. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi: İstanbul, 2001:75-82.
- Karahan C. Tanısal Mikrobiyolojide flüoresan in situ hibridizasyon uygulamaları. In: Tekeli A, Ustaçelebi Ş, eds. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Palme Yayıncılık: Ankara, 2006:3-18.
- Amann RI. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkerman ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ, eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1995:1-15.
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38:830-8.
- Börekçi G, Ersöz G, Otağ F ve ark. Identification of *Candida* species from blood cultures with fluorescent in situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and conventional culture methods. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2010; 27:183-91.
- Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. Bio Techniques 2008; 45:385-409.
- İnce O, Kolukırcık M, Cetecioğlu Z, Eyice O, Tamerler C, İnce B. Methanogenic and sulfate reducing bacterial population levels in a full-scale anaerobic reactor treating pulp and paper industry wastewater using fluorescence in situ hybridization. Water Science and Technology 2007; 55:183-91.
- Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridisation (FISH)-the next generation. FEMS Microbiol Lett 2005; 246:151-8.
- Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM. Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. Cancer Genet Cytogenet 2010; 203:102-26.
- Ho SS, Choolani MA. FlashFISH: "same day" prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies. Methods Mol Biol 2010; 659:261-8.
- Amann RI, Wolfgang L, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 1995; 59:143-69.
- Amann R, Glöckner FO, Neef A. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiology Reviews 1997; 59:191-200.
- Microbial systems ecology. Fixation protocols. 2010. [http://www.microbialsystemsecology.de/pictures/final\_images\_website/Fixation\_protocols.pdf]
- Microbial systems ecology. FISH protocol. 2010. [http://www.microbialsystemsecology.de/pictures/final\_images\_website/FISH\_protocols.pdf]
- Aman R, Kühl M. In situ methods for assessment of microorganism and their activities. Curr Opin Microbiol 1998; 1:352-8.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. Syst Appl Microbiol 2003; 26:327-37.
- Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization-RING-FISH. Mol Microbiol 2004; 51:89-96.
- Aman R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nature Reviews Microbiology 2008; 6:340-8.
- Microbial systems ecology. probeBase an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. 2010. [http://www.microbial-ecology.net/probebase/default.asp?mode=search]
- Probecheck: a central resource for evaluating probe and primer specificity. 2010. [http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/probecheck.pl]
- Silva. Comprehensive ribosomal RNA databases. 2010. [http://www.arb-silva.de/fish-probes/#c153]
- Microsynth laboratory. 2010. [http://www.microsynth.ch]
- Biomers.net. 2010. [http://www.biomers.net/index.html]
- AdvanDx. PNA-FISH. 2010. [http://www.advandx.com]
- Izinta Trading Co. Ltd. 2010. [http://www.izinta.hu/index.html]

27. 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. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:1919-25.
28. Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:4504-13.
29. Wagner M, Erhart R, Manz W, et al. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:792-800.
30. Stoffels M, Amann R, Ludwig W, Hekmat D, Schleifer KH. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:930-9.
31. Wellinghausen N, Wirths B, Poppert S. Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of *Achromobacter xylosoxidans* and *Alcaligenes faecalis* recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3415-7.
32. Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenacker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 818-25.
33. Böckelmann U, Manz W, Neu T, Szewzyk U. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates (river snow) in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbial Ecology* 2006; 33:157-70.
34. Manz W, Amann R, Szewzyk R, et al. In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiol* 1995; 141:29-39.
35. Grimm D, Merkert H, Ludwig W, Schleifer KH, Hacker J, Brand BC. Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:2686-90.
36. Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3336-45.
37. Poppert S, Essig A, Marre R, Wagner M, Horn M. Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:4081-9.
38. Bohnert J, Hübner B, Botzenhart K. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int J Hyg Environ Health* 2000; 203:77-82.
39. Neef A, Amann R, Schleifer KH. Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. *Syst Appl Microbiol* 1995; 18:113-22.
40. Amann R, Ludwig W, Schulze R, Spring S, Moore E, Schleifer KH. rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. *Syst Appl Microbiol* 1996; 19:501-9.
41. Trebesius K, Leitritz L, Adler K, Schubert S, Autenrieth IB, Heesemann J. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 2000; 188:169-75.
42. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization. *Gut* 2000; 46:608-14.
43. Poppert S, Haas M, Yildiz T, et al. Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2133-6.
44. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4138-41.
45. Dorsch MR, Veal DA. Oligonucleotide probes for specific detection of *Giardia lamblia* cysts by fluorescent in situ hybridization. *J Appl Microbiol* 2001; 90:836-42.
46. Vesey G, Ashbolt N, Fricker EJ, et al. The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Appl Microbiol* 1998; 85:429-40.
47. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988; 334:519-22.
48. Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A, Bartel M, Essig A, Poppert S. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1828-30.
49. Stender H, Lund K, Petersen KH, et al. Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and non-tuberculous *Mycobacterium* species in smears of *Mycobacterium* cultures. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2760-5.

50. Arnoldi J, Schlüter C, Duchrow M, et al. Species-specific assessment of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1992; 66:618-23.
51. Moraru CL. Development of protocols for in situ detection of genes in microorganisms [Master Thesis]. Germany: University of Bremen, 2006.
52. Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:302-9.
53. Shepard JR, Addison RM, Alexander BD, et al. Multi-center evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2008; 46:50-5.
54. Sarkar P, Sridharan S, Luchowski R, et al. Photophysical properties of a new DyLight 594 dye. *J Photochem Photobiol B* 2010; 98:35-9.
55. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:1179-88.
56. Yılmaz S, Öztürk M, Arı Ş. Nükleik asit melezlemesine dayalı yöntemler. Temizkan G, Arda N, eds. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi, 1999: 69-106.
57. Hartmann H, Stender H, Schäfer A, Autenrieth IB, Kempf VA. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4855-7.
58. Nikon microscopy; fluorescence filter combinations. 2010. [<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/filterindex.html>].
59. Ünal R, Fenerci E. Konfokal Mikroskop ve Uygulama Alanları. In: II. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi ve V. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu, Özet Kitabı; 26-27 Mayıs 2006 İstanbul 2006. sayfa 43.