

MOLEKÜLER TANI TESTLERİNİN DİRENÇ TAYİNİNDE KULLANIMI: GRAM POZİTİF BAKTERİLER İÇİN HIZLI MOLEKÜLER TANI TESTLERİ

Bülent BOZDOĞAN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN
bbozdogan@adu.edu.tr

ÖZET

Nozokomial infeksiyonlar arasında Gram pozitif etkenlerin görülme sıklığının artması bu tip infeksiyonların yaygınlaşmasını önlemek için önlemler alınmasını gerektirmiştir. Özellikle antibiyotik dirençli etkenlerin hastanelerde yaygınlaşması tedavi sorunlarını da birlikte getirmiştir. Bu nedenle özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli enterokokların erken tanısı ve çabuk tanısı önem kazanmıştır. Kültüre dayalı yöntemler yanında hızlı sonuç veren moleküler yöntemler de son yıllarda rutinde kullanılmaya başlamıştır. Amerika'da FDA tarafından onaylanan moleküler yöntemler kullanan ticari kitler tarama amaçlı olarak pazara sürülmüştür. Bunlara ek olarak farklı moleküler tekniklerin hızlı tanı amacıyla kullanılmasına yönelik çalışmalar birçok çalışma grubu tarafından yürütülmektedir.

Anahtar sözcükler: FDA, Gram pozitif bakteriler, hızlı moleküler tanı, MRSA, VRE

SUMMARY

Use of Molecular Methods for Resistance Detection: Rapid Molecular Detection Tests for Gram Positive Bacteria

Increase of frequency of Gram positive bacteria as nosocomial pathogens forced institutions to take measures for avoiding dissemination of infections due to these pathogens. Especially dissemination of Gram positive pathogens with antimicrobial resistance cause therapy problems for the infections with these bacteria. For that reason early detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant enterococci became an important issue. Lately besides culture based methods, molecular methods are also started to be used for routine detection purpose of these isolates. FDA approved use of molecular kits for screening of these pathogens, and these kits became commercially available. In addition to these kits, research groups intend to use distinct molecular methods for identification of antimicrobial resistant Gram positive bacteria.

Keywords: FDA, Gram positive bacteria, MRSA, rapid molecular diagnosis, VRE

Gram pozitif bakterilerin hastane infeksiyonu etkeni olarak görülme sıklığının artması bu etkenlere yönelik mücadelenin önem kazanmasına yol açmıştır. Hastane ortamlarında çoklu dirençli bakterilerin daha yaygın olarak bulunması bu etkenlerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde de sorunların yaşanmasına neden olmuştur. Yalnızca hastane infeksiyonlarında kullanılan antimikrobiklere de direnç kazanılması ve dirençli etkenlerin yayılması hastane infeksiyonu kontrol önlemlerinde ciddiye ve katı önlemlerle bu etkenlerin hastanede yayılmasının önlenmeye çalışılmasını da beraber getirmiştir. Hastanın hastaneye yatırılmasında, daha da önemlisi yoğun bakım ünitelerine

alınması öncesinde dirençli hastane infeksiyon etkenleri yönünde araştırılması yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Özellikle Gram pozitif bakterilerden metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. yönünden hastaların araştırılması önemli hale gelmiştir. Çünkü bu etkenlerin varlığı tedavi açısından daha sorunlu infeksiyonların oluşmasına yol açmakta, hastanede kalış süresi ve sonuç olarak maliyette de artışa neden olmaktadır.

Hastalarda dirençli suşların tespitinin hem hastanın iyileşme sürecini etkilemesi hem de tedavi maliyetinde önemli olması bu tür etkenlerin erken tespitini önemli hale getirmiştir.

Klasik birtakım yöntemler yanında moleküler temelli yöntemlerin de geliştirilmesi bu etkenlerin birkaç saat içerisinde tespit edilip gerekli hastane infeksiyonu kontrol önlemlerinin uygulanması için son derece önemli hale gelmiştir.

Antimikrobial direnç tespiti

En yaygın olarak kullanılan antibiyotik duyarlılık testinin Kirby ve Bauer^(1,2) tarafından önerilmesinden beri 53 yıl geçmiş. Pek çok alternatif yöntem geliştirilmesine rağmen disk difüzyon yöntemi hâlâ değerini ve yaygın kullanılır olma özelliğini yitirmemiş ve tüm dünyada kullanılan standart bir yöntem haline gelmiştir. Geliştirilen E test, otomatik duyarlılık sistemleri ise standardizasyonu iyileştirmelerine rağmen disk difüzyon testinin de sorunu olan zaman sorununa çözüm getirememişlerdir. Günümüzde geliştirilen ve bir kısmı kullanıma girmiş olan moleküler sistemler ve çabuk tanı yöntemleri standardizasyon yanında çabuk sonuç verme özellikleri nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha sıklıkla görmeye alışacağımız yöntemler olma yolundadırlar.

Moleküler yöntemler

MRSA tanı yöntemleri: FDA onaylı ticari kitler

FDA tarafından onaylanmış tanı yöntemleri arasında çeşitli nükleik asit amplifikasyonu temelli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin esasları ve kullanım alanları aşağıda açıklanmıştır.

1) NucILSENSEasyQ MRSA Assay

BioMérieux firması tarafından geliştirilen bu yöntem MRSA tarafından kolonize olmuş hastaların belirlenmesini amaçlamıştır. Bu yöntem NASBA temellidir (nucleic acid sequence-based amplification). Compton⁽⁵⁾ tarafından 1991'de geliştirilen bu amplifikasyon yönteminde tek ve sabit sıcaklık, 41°C kullanılır. Örnekteki RNA'ya komplementer primer 3' ucuna yapışır ve revers transkriptaz komplementer DNA iplikçliğini oluşturur. RNAz H DNA ile hibrid haldeki RNA'yı yıkıma uğratar. İkinci primer oluşan DNA'nın 5' ucuna yapışır ve T7 RNA polimeraz komplementer RNA oluşturur, bu RNA yeniden komplementer DNA sentezi için kullanılır. Reaksiyonun eşzamanlı (real time)

tespiti için moleküler beacon problemleri kullanılır. bioMérieux tarafından geliştirilen sistemde ise *mecA* geni ve *SCCmec* kasedinde *orfX* gen fragmanları çoğaltılır.

2) BD GENE OHM MRSA ASSAY (Eski adı IDI-MRSA)

FDA tarafından burunda MRSA taşıyıcılığının tespiti için onaylanan bir diğer test de Beckton Dickinson (BD) firması tarafından geliştirilmiştir. Real time PCR yöntemiyle DNA amplifikasyon prensibine dayalı bu yöntemde *S. aureus* suşlarına özgü bir gen olan *orfX* geni ile *SCCmec* (*Staphylococcus* casset techromosome) taşınabilir elemanın birleştiği bölgeden bir DNA fragmanı çoğaltılır. Hastanın burun çukurundan alınan örnekteki bakteriler kültür ihtiyacı duymadan liz solüsyonu ile parçalanır ve elde edilen DNA real time PCR amplifikasyonu için kullanılır. Synder ve ark.⁽¹³⁾ 2010 yılında bu tarama testinin kültür testlerinden üstün performans gösterdiğini rapor etmişlerdir^(7,8). Yeni bir liz solüsyonu eklenmesiyle bu yöntemdeki örnek hazırlama aşamaları daha basitleşmiş ve iyi düzeyde hassasiyet elde edilmiştir. Yeni liz solüsyonuna eklenen achromopeptidase enzimi nedeniyle yöntem BD GeneOhm MRSA ACP Assay adını almıştır⁽¹¹⁾.

3) Xpert MRSA/SA, Xpert MRDA/SSTI, Xpert MRSA/BC (CEPHEID)⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Cepheid firması tarafından geliştirilen bu yöntem real time PCR temellidir. Toplam işlemin ve sonuç alınmasının yaklaşık 50 dakika sürmesi nedeniyle FDA tarafından onaylanan moleküler testler arasında en kısa sürede sonuç veren yöntemdir. FDA tarafından burun kolonizasyonu deteksiyonu, pozitif kan kültüründe ve deri yumuşak doku infeksiyonlarında MRSA varlığının belirlenmesi için geliştirilen yöntemler onaylanmıştır. Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından direkt olarak alınan örneklerin (swap ile) çalışılmasıyla sonuç verir. Gene Xpert sistemi örneğin hazırlanması, nükleik asit ekstraksiyonu, hedef genin tespiti için real time PCR reaksiyonlarını tek kullanımlık ve tek örnek için hazırlanmış bir kartuş içerisinde gerçekleştirir. Örneğin konulmasından itibaren hiçbir işlem için müdahale gerektirmez. Odalardan oluşmuş kartuş içerisinde verilen örneğin farklı odalara geçerek reaksiyonların gerçekleşmesi

için kartuş rotasyonlara tabi tutulur. Örnek izole edilir, PCR inhibitörleri temizlenir, örnek ultrasonikasyonla lize edilir. Daha sonra PCR reaktifleriyle birleştirilir ve reaksiyon tüpüne aktarılır. Burada real time PCR işlemi gerçekleşir. Xpert MRSA/SA SSTI spa, *mecA* ve kromozomdaki *attB* bölgesi olmak üzere üç bölgeyi çoğaltır.

4) LightCycler MRSA Advanced Test

Roche firması tarafından geliştirilen MRSA erken tanı yöntemi FDA tarafından onaylanmıştır. Real time PCR prensibine dayalı bu yöntemde bakteri duvarının mekanik yöntemlerle parçalanması ve DNA saflaştırılmasını takiben hedef DNA'nın real time PCR yöntemiyle çoğaltılması ve spesifik bir probla hibridizasyonu sayesinde deteksiyonu esastır. Bu yöntemde *SCCmec* ile *orfX*'in sağ birleşme bölgesinin deteksiyonu amaçlanmıştır⁽¹⁰⁾.

VRE tanı yöntemleri: FDA onaylı ticari kitle

1) XpertvanA test⁽¹⁸⁾

Cepheid firması tarafından geliştirilen ve FDA tarafından onaylanan bu yöntemde rektal swab örneklerinden vankomisin direnç varlığının tespiti hedeflenmiştir. MRSA için geliştirilen yöntem gibi kapalı ve otomatize olarak geliştirilmiştir ve mültipleks real time PCR temellidir (FDA53). Elüsyon solüsyonu içerisinde homojen hale getirilen rektal swab örneği çok odalı şekilde hazırlanmış kartuş içerisine aktarılır. Daha sonraki işlemlerin tam otomatize olduğu bu sistemde *vanA* gen deteksiyonu 45 dakika sürmektedir.

Hızlı tanı yöntemlerinin geleceği

Maliyetleri günümüzde örnek başına 25 € civarı olan tam otomatize tarama yöntemleri yakın bir gelecekte daha ulaşılabilir ve yaygın kullanılabilir hale gelecektir. Yukarıda bahsedilen yöntemler dışında birtakım yeni yöntemler geliştirme çabası da sürmektedir. Birkaç saatte sonuç veren kültür yöntemleri MRSA ve VRSA⁽⁴⁾ için geliştirilirken yeni moleküler yöntemler de geliştirilmektedir. Beuving ve ark.⁽³⁾'ün geliştirdiği MİK testiyle kombine bakteri spesifik 16S rRNA'nın real time PCR ile çoğaltılması yöntemine RAMAST adı verilmiş ve >% 95 hassasiyet göstermiştir.

Kültür ve moleküler yöntemlerin ortakla-

şa kullanıldığı bir diğer yöntem ise peptid nukleik asit (PNA) problemleri kullanarak yapılanlardır. Shrestha ve ark.⁽¹²⁾ *S.aureus* spesifik PNA problemleri kullanarak oksasilin varlığında 2 saat bakteriyi inkübe etmişler ve flow sitometriden geçirerek floresans varlığına göre üremeyi, sonuç olarak MSSA ve MRSA farkını ortaya koymuşlardır.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) yöntemi elektrot yüzeyine tutunmuş tek iplikli proba hedef DNA'nın tutunmasıyla artan negatif yükün ölçümüne dayalı bir sistemdir. Corrigan ve ark.⁽⁶⁾ bu yöntemi kullanarak *mecA* geninin varlığını göstermişler ve hızlı tanı yöntemleri için kullanılabilir bir teknik olduğunu rapor etmişlerdir.

Mikro akışkan ve mikro elektro-mekanik sistemlerin kullanılmasına başlanmışsa da hiçbir makro cihazın kullanılmadığı, direkt örnekten etken ve direncin tespit edilebileceği yöntemlerin de geliştirilebilmesine yönelik çalışmalar başlamıştır. Nano teknolojinin kullanımıyla tam otomatik mikro sistemlerin gelecekte rutin kullanıma girmesi mümkün olacaktır⁽⁹⁾.

İnfeksiyon hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde hızlı tanı testleri önemlidir. Özellikle yoğun bakıma alınacak hastalarda hastane infeksiyon etkenleri arasında önemli yer tutan MRSA ve VRE gibi etkenlerin varlığının taranması ve bunun kısa sürede yapılması hastane infeksiyonlarının yaygınlığının önlenmesinde önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):493-6. PMID:5325707
2. Bauer AW, Perry DM, Kirby WMM. Single disc antibiotic sensitivity testing of staphylococci: an analysis of technique and results, *AMA Arch Intern Med* 1959;104(2):208-16. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1959.00270080034004> PMID:13669774
3. Beuving J, Verbon A, Gronthoud FA, Stobberingh EE, Wolffs PF. Antibiotic susceptibility testing of grown blood cultures by combining culture and

- real-time polymerase chain reaction is rapid and effective, *PLoS One* 2011;6(12):e27689.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027689>
 PMid:22194790 PMCID:3237415
4. Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC et al. Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 2006;44(2):580-2.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.2.580-582.2006>
 PMid:16455915 PMCID:1392707
 5. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification, *Nature* 1991;350(6313):91-2.
<http://dx.doi.org/10.1038/350091a0>
 PMid:1706072
 6. Corrigan DK, Schulze H, Henihan G et al. Impedimetric detection of single-stranded PCR products derived from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, *Biosens Bioelectron* (2012). PMID: 22365363
 7. Desjardins M, Guibord C, Lalonde B et al. Evaluation of the IDI-MRSA assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal and rectal specimens pooled in a selective broth, *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1219-23.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1219-1223.2006>
 PMid:16597841 PMCID:1448652
 8. Farley JE, Paul D et al. Comparison of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from an at-risk community population, *J Clin Microbiol* 2008;46(2):743-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02071-07>
 PMid:18057129 PMCID:2238090
 9. Koydemir CH, Kulah H, zgen C, Alp A, Haşelik G. MEMS biosensors for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Biosens Bioelectron* 2011;29(1):1-12.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.071>
 PMid:21856144
 10. Light Cycler MRSA Advanced Test. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K091409.pdf
 11. Patel AP, Nathan A. Ledebøer et al. Performance of the BD GeneOhm MRSA achromopeptidase assay for real-time PCR detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal specimens, *J Clin Microbiol* 2011;49(6):2266-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02431-10>
 PMid:21508148 PMCID:3122740
 12. Shrestha NK, Scalera NM, Wilson DA, Brehm-Stecher B, Procop GW. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance by flow cytometry using a peptide nucleic acid probe, *J Clin Microbiol* 2011;49(9):3383-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01098-11>
 PMid:21795508 PMCID:3165574
 13. Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Comparison of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from intensive care unit patients, *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1305-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01326-09>
 PMid:20181916 PMCID:2849557
 14. Strenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations, *Ger Med Sci* 2009;7:Doc06.
 15. Xpert MRSA http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K070462.pdf
 16. Xpert MRSA/SA Blood culture http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K101879.pdf
 17. Xpert MRSA/SSTI http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf8/K080837.pdf
 18. Xpert VRE http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf9/K092953.pdf