

# ANTİBİYOTİK DİRENCİ ve MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

Serhat ÜNAL

Bakteriyolojide, klinik örneklerden bakterinin izole edilmesi, üretilmesi ve değişik antibiyotiklere duyarlılığın in-vitro belirlenmesi günümüzde en çok kullanılan direnç saptama tekniğidir. Son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nükleik asit saptamaya dayanan tekniklerle gerçekleştirilen genotipik yaklaşımlar gündeme gelmiştir. Genotip özelliklerinin belirlenmesinin dışında antibiyotik direnci tespitinde bu yaklaşımın alternatif olarak gündeme gelmesinin nedeni laboratuvar tanida olduğu gibi nükleik asit saptamaya yönelik yöntemlerin bazı önemli avantajlara sahip olmasıdır. Bu avantajların başında üretilmesi mümkün olmayan veya zor olan mikroorganizmalara ait bilgilerin kısa sürede alınabilmesi gelmektedir.

Antibiyotik direncinin belirlenmesinin infeksiyon hastalıklarında esas olarak iki amacı vardır:

- 1- Hastaya verilecek antibiyotik tedavisinin uygunluğunun belirlenmesi
- 2- Epidemiyolojik takiplerin yapılabilmesi.

Yeni bir suç ile salgın olmadıkça bakteri cinsi ve tipinin erken dönemde tayin edilmesi antibiyotik direnç profili hakkında ön fikir verebilir. Bu yönü de katılarak klinik mikrobiyolojide genotipik yaklaşımı iki ana grupta toplama mümkündür:

- I- Epidemiyolojik tiplendirme
- II- Antibiyotik direnç geninin saptanması.

## **I- Epidemiyolojik tiplendirme**

Epidemiyolojik tiplendirmenin yukarıda bahsedilen amaçlara hizmet edebilmesi için bakteri tipinin sahip olduğu fenotipik direnç patefninin önceden bilinmesi gereklidir. Bakteri tiplendirmesinin amacı bir salgın sırasında epidemiyolojik bağlantısı olan izolatların aynı kökenden kaynak alıp almadığını genetik olarak ispatlamaktır. DNA fingerprint'leri ya da profilleri, belli bir klondan köken almış izolatlar için özgül olan ve değişik boyutlardaki DNA moleküllerinden (plazmid veya kromozomal) oluşan paternleri temsil ederler. Günümüzde, epidemiyolojik açıdan ilişkili olan organizmları ayırdetmek amacıyla çok sayıda yöntem denenmektedir.

## **II- Antibiyotik direnç genlerinin saptanması**

Klasik bakteri izolasyon yöntemlerinin en önemli sorunu yeterince hızlı olamamalarıdır. Örnek alındıktan sonra üremenin olabilmesi için belli bir zamana ihtiyaç vardır. Ayrıca tanımlama işlemleri ve duyarlılık testleri de ancak subkültürlerde yapılabilmektedir. Bu da ikinci bir üreme zamanını gerektirmektedir. Üreme zamanı bakterilere göre değişmekte, örneğin piyojenik bir infeksiyonda stafilocoklar için 24-48 saat iken tüberkülozda bu süre 4-6 haftaya kadar uzamaktadır. Ayrıca bazı mikroorganizmları ise bu yapay ortamlarda üretmek hiç mümkün olmamaktadır. Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi, bakterilerde direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve direnç genlerinin tanınması, işleyişlerinin anlaşılması genotipik yaklaşımının gündeme getirmiştir.

Genotipik yaklaşımın bu alanda gerçekleştirilebilmesi için antibiyotik direncinden sorumlu genin nükleik asit dizgesi bilinmelidir. Günümüzde aşağıda örnekleri veri-

len antibiyotik direncinden sorumlu kromozom veya plazmid üzerinde çok sayıda gen tanımlanmış ve bunların dizgeleri, dirençten sorumlu bölgeleri ortaya çıkarılmıştır. Klinik tanıda kullanılan nükleik asit saptamaya yönelik yöntemlerde olduğu gibi antibiyotik direnç geninin saptanmasında da iki ana teknik uygulamadır, hibridizasyon ve in-vitro nükleik asit amplifikasyon teknikleri. Yukarıda bahsedildiği gibi işaretli nükleik asit kullanılarak gerçekleştirilen hibridizasyon tekniklerinin klinik örnekten direkt uygulamalarında duyarlılıklar yetersiz kalmaktadır. Ancak günümüzde *M.tuberculosis* gibi geç üreyen ajanların sıvı besiyerlerindeki kültürleri erken dönemde dirençten sorumlu genin saptanmasına olanak vermektedirler. Direkt klinik örnekten direnç geninin saptanmasında nükleik amplifikasyon yöntemleri önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir. Nükleik asid amplifikasyon teknikleri bütün bu avantajlarına rağmen, halen rutin klinik kullanıma girebilecek, sorunsuz uygulanabilecek teknikler degillerdir.

PCR ile saptanabilen antibiyotik direnç genleri:

- 1- Stafilocoklarda metisilin direncinin tespiti.
2. *M.tuberculosis*'te *rpoB* geni: Rifampisin direnciden sorumlu nokta mutasyonların saptanması: PCR sonrası SSCP uygulanması.

3. Gram-pozitif bakterilerde eritromisin direnç genleri: *S.aureus*'da *ErmA*, *E.coli*'de *ErmBC* ve *B.sphaericus*'da *ErmG* gen bölgelerinin dejener primerler ile amplifikasyonu.

4- TEM geni taşıyan plazmidlerin saptanması: *N.gonorrhoeae*'da penisilinaz yapımının tespiti.

5- Aminoglikozid direnç genleri: Aminoglikozid-modifiye eden enzim (AAC, APH, ANT) bölgelerinin saptanması.

6- TEM enzimlerinin (TEM-1, TEM-2) yapımından sorumlu plazmid bölgeleri; Gram negatif enterik bakterilerde "extended-spectrum" beta-laktamaz yapımının tespiti.

Bugüne kadar beta-laktam, aminoglikozid, tetraşiklin, glükopeptidler, kloramfenikol, makrolidler, trimetoprim ve ağır metal direnç genleri dahil olmak üzere çok sayıda direnç geni ve bunlara özgünlük problemleri tariflenmiştir. Ancak bu primer ve prob setlerinin fenotipik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilirleri her organizma ve antimikrobiyal ajan için uygun değildir. Örneğin enterik bakterilerin çoğu induklenebilir kromozomal ampisilin direnç genine sahiptir. Sonuç olarak direnç geninin saptanması klinik olarak duyarlı veya dirençli mikroorganizmanın saptanmasında faydalı olmaz. Ancak direnç geninin mRNA'sının kantitatif saptanması ile bu problemler çözülebilir. Günümüzde bu yaklaşımardan klinikte uygulanabilirliği en uygun olan stafilocoklarda *mecA* geninin direkt klinik örnekten saptanmasıdır. Antibiyotik direnci dışında genotipik yaklaşımlar daha az olarak antiviral, antifungal ve antiparaziter direnç genlerinin saptanmasında da uygulanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- 1- Arbeit RD: Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, "PR Murray, EJ Baron, MA Pfaler, FC Tenover, RH Yolken (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6.baskı" kitabında s.190, American Society of Microbiology, Washington DC (1995).
- 2- Archer G, Pennel E: Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe, *Antimicrob Agents Chemother* 34:1720 (1990).
- 3- Arthur M, Molinas C, Mabilat C, Courvalin P: Detection of erythromycin resistance by the polymerase chain reaction using primers in conserved regions of erm rRNA methylase genes, *Antimicrob Agents Chemother* 34:2024 (1990).
- 4- Bergström S, Olsson O, Normark S: Common evolutionary origin of beta-lactamase genes in enterobacteria, *J Bacteriol* 150:528 (1982).

- 5- Courvalin P: Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 35:1019 (1991).
- 6- Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema ARJ, McAdam RA, Catty D, van Embden JDA: Insertional sequence IS986 from M.tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis, *J Clin Microbiol* 28:2051 (1990).
- 7- Kostman JR, Alden MB, Mair M, Edling TD, LiPuma JJ, Stull L: A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping, *J Infect Dis* 171:204 (1995).
- 8- Ligozzi M, Rossolini GM, Tonin EA, Fontana R: Nonradioactive DNA probe for detection of gene for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 35:575 (1991).
- 9- Persing D, Smith FT, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*, American Society for Microbiology, Washington DC (1993).
- 10- Persing DH: In vitro nucleic acid amplification techniques, "Persing D, Smith FT, Tenover FC, White DJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*" kitabinda s.51, American Society for Microbiology, Washington DC (1993).
- 11- Pfaller MA: Diagnostic applications of DNA probes, *Infect Control Hosp Epidemiol* 12:103 (1991).
- 12- Predari SC, Ligozzi M, Fontana R: Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction, *Antimicrob Agents Chemother* 35:2568 (1991).
- 13- Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD: A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA, *J Infect Dis* 157:280 (1988).
- 14- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Schopfer K, Bodmer T: Detection of rifampicin-resistance mutations in *M.tuberculosis*, *Lancet* 341:647 (1993).
- 15- Tenover FC, Arbeit RD, Goerng RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: Interpreting chromozomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol* 33:2233 (1995).
- 16- Tenover FC: Plasmid fingerprinting. A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial community acquired infection, *Clin Lab Med* 5:413 (1986).
- 17- Tomasz A, Drugeo HB, De Lencastre HM, Jubes D, McDougall L, Bille J: New mechanism for methicillin resistance in *S.aureus*: Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity, *Antimicrob Agents Chemother* 33:1869 (1989).
- 18- Tomkins LS, Tenover F, Arvin A: New technology in the clinical microbiology laboratory: What you always wanted to know but were afraid to ask, *J Infect Dis* 170:1068 (1994).
- 19- Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M: Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products, *J Clin Microbiol* 30:1728 (1992).
- 20- Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch J, Wu E, Preston D, Skatrud P: Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 30:1685 (1992).
- 21- Welsh J, McClelland M: Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR, "Persing D, Smith FT, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*" kitabinda s.595, American Society for Microbiology, Washington DC (1993).