

GRAM NEGATİF ÇOMAKLARDA GSBL DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Haluk VAHABOĞLU

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Umuttepe-KOCAELİ
vahabo@hotmail.com

ÖZET

Bu oturmuda sık rastlanan dört Gram negatif çomakta (Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter) GSBL tanımlamak için uygulanacak metotları ve algoritmayı tartışacağım. Rutin uygulamada fenotipik olarak GSBL varlığı saptandıktan sonra birtakım moleküler genetik ve enzimatik deneyler yapılmalıdır. İzoelektrik odaklama, birtakım plazmid deneyleri, PCR ile tarama, klonlama ve dizi verisinin değerlendirilmesi işlemleri başlıca metotlardır.

Anahtar sözcükler: *Acinetobacter, Escherichia coli, GSBL, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa*

SUMMARY

Identification of ESBLs in Gram Negative Rods

Here, I will discuss the methods and the algorithm frequently applied to identify the ESBLs in four common Gram negative rods, namely Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter. Phenotypic identification of an ESBL, although not an easy task in Acinetobacter and P. aeruginosa due to certain intrinsic mechanisms, during a routine laboratory work have to be followed by a couple of molecular genetic and enzymatic experiments to achieve an accurate identification. Isoelectric focusing, a number of plasmid work, PCR screening, cloning and the analysis of the sequence data are the measures to be mentioned.

Keywords: *Acinetobacter, ESBL, Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa*

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) terimi genel olarak oksiiimino-sefalosporinleri inaktive eden Class A⁽¹⁾ enzimleri tanımlar. İlk kez 1980'li yılların başında Avrupa'da fark edilmiş olan GSBL türü enzimler⁽²⁾ günümüzde en yaygın beta-laktam direnç mekanizması olarak önemini korumaktadır^(3,5,6,8). Günümüzde rutin laboratuvar uygulamalarında Gram negatif çomakların antibiyotiklere duyarlı-dirençli olarak rapor edilmeleri yeterli kabul edilmemekte ve ek olarak GSBL türü enzim varlığının araştırılarak rapor edilmesi önerilmektedir⁽⁴⁾. Bu anlamda rutin laboratuvarlarda GSBL tespit etmek için bazı fenotipik metotlar önerilmektedir. Bunların tamamı klavulanik asitin Class A GSBL türü enzimleri etkisizleştirilmesi esasına dayanır.

Burada bu metotlardan bahsetmeyeceğim. Daha ziyade araştırma laboratuvarlarında rutin incelemede fenotipik olarak tespit edilmiş bir

GSBL türü enzimin tanımlanması için izlenecek metotları tartışmaya çalışacağım. Fenotipik olarak GSBL saptandıktan sonra neler yapmamız gerektiği bu konuşmanın konusu olacak.

Konuyu detaylandırmadan önce iki noktayı hatırlatmak isterim: 1. Bu tür enzimleri çoğu kez *Escherichia coli, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde görüyoruz ve bu bakterilerden *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri birçok başka içsel direnç mekanizması taşıdığı için fenotipik testler aldatici olabilmektedir. 2. Artık maalesef birçok -özellikle hastane kökenli- izolatta birden fazla ve farklı tür enzimler bir arada olmaktadır ki bu da hem fenotipik hem de genotipik çalışmalarda bazı zorluklar oluşturmaktadır. Bu iki problemi aklımızda tutarak bir tek GSBL türü enzim yapan bir *E.coli* izolatında enzimi tanımlamak için neler yapmamız gerektiğini tartışacağız.

1. İzoelektrik odaklama⁽⁷⁾: İlk yapılması gereken işlemdir. Bu işlem bize bakterinin kaç adet enzim saldığını ve o enzimlerin pI değerlerini gösterecektir. Tek bir enzim ile karşı karşıya isek araştırmamız daha kolay yürüyecek demektir. Enzimin pI değeri bize genetik yapısı hakkında bilgi verir. Mesela TEM ailesine mensup enzimler asidik pH'da (<pI 6.5), SHV nötr (bazı varyantlar ise bazik) ve CTX-M türü ise bazik pH'da görülür.

2. Plasmid transferi: Özellikle *E.coli* ve *Klebsiella* türlerinde bu deney çok başarılı ve dolayısı ile kıymetlidir. Bir alıcı *E.coli* ile karşılaştırılan bakteri plazmidini (plazmidin özelliği olarak) alıcı suşa aktarabilir. Bu durumda aktarılan alıcıda da GSBL tespit ederiz. Eğer transkonjugasyon denilen bu istekli aktarım gerçekleşmez ise bu sefer transformasyon denilen bir prosedür uygulanır. Bakterimizden plazmid izole edilip bu plazmid alıcıya aktarılır.

3. PCR ile beta-laktamaz geninin tespiti: Bu işlem alıcı *E.coli* ile yapılmalıdır. Bize hangi tür olabileceği hakkında izoelektrik odaklama deneyi bir bilgi vermiş idi. Bu bilginin yönlendirdiği enzimler için PCR ile tarama yapılır. Mesela pI değeri 6.3 olan bir enzim görmüş ve aktarmış isek öncelikle TEM ailesi için evrensel bir primer çifti ile tarama yapılır.

4. Klonlama ve dizi analizi: Bir GSBL türü enzimin adını koyabilmek için mutlaka dizi analizi yapılması gerekir. Bu işlem ya genin tamamının PCR ile çoğaltılması ile elde edilen üründe ya da gen parçası bir alıcı plazmide klonlanmış ise plazmidde yapılır.

5. Dizinin gen bankasında kıyaslanması ve adlandırılması: Elde edilen dizi GenBankası'na karşı kıyaslanarak bilinen bir enzim mi yok-

sa yeni bir GSBL ile mi karşı karşıya olduğumuzu anlarız. Yeni bir enzimi isimlendirmek için <http://www.lahey.org/Studies/> sitesinden faydalanmak gerekir.

KAYNAKLAR

1. Ambler RP: The structure of beta-lactamases, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289(1036):321-31.
2. Bauernfeind A, Petermuller C, Jungwirth R: Inactivation of cephalosporins by beta-lactamases of gram-negative rods, *Infection* 1983;11(Suppl 1):S39-43.
3. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN, Sentry APAC Study Group: Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99), *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42(3):193-8.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa (2005).
5. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J: Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 and 1998, *Clin Infect Dis* 2000;30(3):454-60.
6. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M et al: CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe, *J Antimicrob Chemother* 2007;59(2):165-74.
7. Mathew A, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW: The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases, *J Gen Microbiol* 1975;8(1):169-78.
8. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N: Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region, *Clin Infect Dis* 2001;32(Suppl 2):S94-103.