

## Antimikrobiyel Direncin Genetik Metotlar ile Saptanması

Alper ÇİFTÇİ<sup>1</sup>

**Özet:** Son yıllarda antimikrobiyel ilaçların bilinçsiz kullanımı sonucunda antimikrobiyel ilaçlara karşı direnç gelişmiştir. Bu direncin konvansiyonel metotlar ile saptanması her zaman kolay ve mümkün değildir. Bu nedenle antimikrobiyel direncin saptanması için genetik metotlar geliştirilmiştir. Bunlardan bir çoğu da klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında şu anda kullanılmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Antimikrobiyel Direnç, Genetik Metotlar

### Antimikrobiyel Direncin Saptanmasında Kullanılan Genetik Metotlar

Antimikrobiyel ilaçlara karşı direncin saptanması için geliştirilen genetik metotların iki ana hedefi vardır: dirence neden olan gen ya da genlerde meydana gelen ve antimikrobiyel dirence neden olan mutasyondur. Bir bakteride bulunan bir gen direkt olarak dirence neden olabilir ve bakteride o genin var olması demek, bakterinin belirli bir antibiyotiğe karşı dirençli olması demektir. Bu durumda bu genin varlığının saptanması ile dirençli olduğu antibiyotik anlaşılabilir. Diğer taraftan bir bakteri normal olarak bir antibiyotiğe karşı duyarlı iken bu bakterinin belirli bir geninde meydana gelen mutasyon, dirence neden olabilir. Bu durumda da o gende meydana gelen mutasyonun saptanması ile dirençli olduğu antibiyotik anlaşılabilir.

#### 1.Branched DNA (bDNA) Analizi

bDNA analizi; hedef nükleik asitin PCR ile amplifikasyonuna gerek duyulmaksızın yapılabilen bir sinyal amplifikasyon metodudur. Kemiluminesans sinyalin amplifikasyonunu temel almaktadır. Ticari olarak Chiron Diagnostics( Norwood, Mass.) tarafından üretilmektedir. Bu analiz ile Stafilokok içeren kültürlerden direkt olarak mecA geni saptanabildiği gibi, HIV ve HCV'nin kandaki seviyeleri de belirlenebilir. Bu metot hedef molekülün değil, sinyal molekülünün çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

---

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dıkapı Ankara. e-posta: [aciftci@veterinary.ankara.edu.tr](mailto:aciftci@veterinary.ankara.edu.tr)

Analiz 96'lık ticari mikroplyetlerde yapılmaktadır. Bakteri hücrelerinin DNA'sı, bakteri hücre duvarının 120 °C 'de alkalın ile parçalanması sureti ile serbest bırakılmaktadır. Serbest hale geçen DNA, hedef problara hibridize olmaktadır. Hibridize olan DNA, mikroplye yüzeyindeki problar tarafından yakalanmaktadır. Sinyal amplifikasyonu amacıyla, ortama bDNA molekülleri eklenir. bDNA molekülleri ortamdaki hedef problara bağlanır. Enzim ile işaretli problar eklenir ve bunlar da bDNA moleküllerine bağlanır. Oluşan bileşiğin işaretlenmesi amacıyla kemiluminesans substrat (dioxetone) eklenir. Kemiluminesans sonucu oluşan ışığın şiddetinin ölçülmesi ile analiz sonucu değerlendirilir (1).

mecA geni saptanması için yapılan bDNA analizi, PCR kadar doğru sonuç vermektedir ve iki test birlikte değerlendirildiği zaman doğruluk oranı %100 olmaktadır. bDNA analizi, PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymaması ile diğer analizlerden ayrılır. En önemli avantajı, DNA ekstraksiyonuna gerek kalmaksızın, kanlı agarda üretilip sıvı besi yerine geçilen mikroorganizmalara direkt olarak uygulanmasıdır (1).

## **2. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi**

Spesifik bir restriksiyon enzimi(RE) tarafından oluşturulan fragment dizilerindeki varyasyonlara RFLP denir. Bu dizilerdeki varyasyonların saptanması amacıyla yapılan analize de RFLP Analizi denir. Restriksiyon enzimleri; DNA sekanslarındaki silinme ya da araya girmeler ve restriksiyon enzimlerinin kestiği bölgelerdeki baz yer değişimleri gibi yeniden sekans düzenlemelerine yol açarak, RFLP oluşturur.

RFLP analizi için ilk olarak bakterinin üretilmesi gereklidir. Üretilen bakterinin DNA'sı izole edildikten sonra saflaştırılır. Saflaştırılan DNA; bir ya da daha fazla restriksiyon enzimi ile ayrı ayrı veya birlikte, uygun şartlar ile muamele edilerek, kesilir. Oluşan restriksiyon fragmentleri agaroz jelde, elektroforeze tabi tutulur. Ayrılmış fragmentler de ethidium bromit ile boyanır. Sonuçta oluşan bantlara bakılarak değerlendirme yapılır.

Son yıllarda vankomisin direncini kodlayan genin saptanması amacıyla RFLP analizi yapılmaktadır (2). *Mycobacterium tuberculosis*'in izoniaside karşı olan direnci, katalaz peroksidaz (katG) geninde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu oluşmaktadır (3). katG'nin belli bölgelerindeki spesifik DNA sekansının saptanması RFLP analizi ile mümkün olmaktadır.

## **3. PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analizi**

PCR-SSCP tekniği ilk olarak, insanlarda fenil ketonuri ve kistik fibrosis gibi hereditör bozukluklara neden olan genlerdeki single nükleotit dizisinin saptanması için geliştirilmiştir. Enterobakterlerde SHV- type extended-  $\beta$  laktamaz spektrumunu kodlayan genlerdeki mutasyonun identifikasyonu ve *M. tuberculosis*'teki izoniasid, rifampin, ethambutol ve florokinolon direncine neden olan genlerdeki mutasyonların saptanması amacıyla da yapılmaktadır.

SSCP tekniği ile mutasyona uğramış tek iplikcikli DNA'lar ile mutasyona uğramamış DNA, poliakrilamid jelde ayırt edilir. Hedef nükleik asit PCR ile amplifiye edildikten sonra, tek iplikcikli olacak şekilde denature edilir. Denature ürünler, poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulur. Elektroforezde kullanılan jel, mutasyon saptamak için kullanılan özel bir jeldir ve MDE ( mutation detection enhancement ) olarak adlandırılmaktadır (4).

İnsanlarda faktör IX genini saptamak amacıyla SSCP tekniğine benzer bir hibrit tekniği olan Dideoxy Fingerprinting (ddF) analizi geliştirilmiştir. ddF tekniğinin prensibi, her mutasyon için karakteristik fingerprint oluşturmak sureti ile mutasyonları saptamaktır. Özellikle nokta mutasyonlarının saptanması için güvenilir bir testtir (5,6). SSCP tekniğinden farkı, cycle-sekanslama reaksiyonu içermesi ve dideoxy-chain terminated ürünlerin oluşturmasıdır.

Felmlee ve ark. (4); ddF tekniğini *M. tuberculosis*'in klinik izolatlarında rifampin direncine neden olan mutasyonları saptamak için kullanmaktadırlar.

#### **4. PCR-Cleavase Fragment Length Polymorphism (CFLP) Analizi**

PCR-CFLP, yeni geliştirilmekte olan bir DNA dizisi tarama metodudur. Bu analiz; değişik DNA dizilerinin ayırt edilmesini sağlayan, yapısal fingerprint ile sonuçlanır (7). Analizde Cleavase I denilen ve DNA'yı baz dizisine göre değil, yapısına göre ayıran bir enzim kullanılmaktadır (8). Örnekler PCR ile amplifiye edildikten sonra, hızla soğutulur. Toka benzeri yapıda DNA fragmenti oluşur. Toka benzeri yapı, cleavase I enzimi eklemek suretiyle kesilir. Bu enzim; toka benzeri yapıdaki tek iplikcik ile kopyalanmış bölge arasındaki birleşme bölgesini tanır ve bu birleşme bölgesini keser. Örnekler jel elektroforezde koşuturulur. Jelde oluşan bant farklılıklarına göre, mutasyonlar identifiye edilebilir. Jel elektroforezde, farklı mutasyonlar ya da farklı genom yapısındaki örnekler, değişik bölgelerde bant oluşumuna yol açar.

PCR-CFLP metodu, katG ve rpoB genlerindeki mutasyonların saptanması ve HCV'nin genotiplendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (7,8,9).

Bu analizin kullanım alanları sınırlıdır. HCV genotiplendirilmesi amacıyla ticari kitleri mevcuttur (Roche Molecular Systems) (7).

## 5. PCR-Moleküler Beacon Sekans Analizi

Piatek ve ark. (10); *M. tuberculosis*'teki rifampin direnci ile ilişkili rpoB genindeki mutasyonun saptanması amacıyla moleküler beacon sekans analizini geliştirmişlerdir. Ayrıca *M. tuberculosis*'te izoniasid direncine neden olan gendeki mutasyonun saptanması için de kullanılmaktadır.

Moleküler beacon, homojen solüsyonlarda spesifik nükleik asit varlığını gösteren florojenik oligonükleotit problardır (11). Bunlar, toka benzeri yapıda moleküllerdir. Molekülün halka yapısı, hedef nükleik asit molekülünün prob sekansını tamamlayacak şekilde düzenlenmiştir. Prob sekansının sonuna yerleşmiş olan tamamlayıcı kol sekansının birleşmesi ile stem yapısı oluşur. Floresan ışığı verme yeteneğinde olan yarım parça kolun bir tarafına, söndürülmüş olan diğer parça da kolun diğer tarafına yerleşir. Stem yapısı bu iki ucun birbiri ile ilişkisini önler. Dolayısı ile floresan ışık veren yarımdaki enerjinin aktarılması yani ışığın sönmesi engellenir. Söndürülmüş yarım, nonfloresan yapıda olduğu için enerjisini ısı olarak açığa çıkarır (10,11,12).

## 6. PCR-Line Probe Assay (LiPA)

PCR-LiPA, katı fazda reverse hibridizasyon prensibine dayanır. Hedef nükleik asit içeren DNA , biotin ile işaretli primerler ile amplifiye edilirler. PCR ürünleri, nitrosellüloz banttaki yakalayıcı problara hibridize edilir. Alkalın fosfataz-streptavidin kompleksi içeren konjugat eklenir. Konjugat, bir önceki adımda oluşan komplekse bağlanır. 5-bromo-4-chromo-3-indolfosfat(BCIP) ve Nitro Blue Tetrazolium (NBT) içeren kromojenik substrat eklenir. Substratın, konjugata bağlanması ile alkalın fosfataz enzimi aktivasyonu sonucunda nitrosellüloz bant üzerinde kromojenik bant oluşur. Nitrosellüloz bant üzerindeki kromojenik bant oluşumu, dirençli etken varlığını gösterir (13).

PCR-LiPA; *M. tuberculosis*'te rifampin direncine neden olan rpoB genindeki mutasyonun hızlı bir şekilde saptanması için kullanılmaktadır. Bu amaçla ticari kitler (INNO-LiPA Rif.TB; Innogenetics, N.V.Zwijnaarde, Belgium) mevcuttur (14).

HIV'in reverse transkriptase genindeki mutasyonun saptanması için de kullanılmaktadır (15).

## 7. PCR-RNA/RNA Duplex RNase Cleavage Analizi

PCR-RNA/RNA duplex RNase cleavage analizi *M. avium* kompleksinde macrolid direncine neden olan 23S rRNA genindeki mutasyonun saptanması amacıyla kullanılmaktadır (16).

PCR-RNA/RNA duplex RNase cleavage analizi, RNase 1 ve RNase T1 enzimleri ile birbirine uymayan kısımların ayrılması esasına dayanır. Zıt fazdaki RNase polimeraz promotörlerini (T7/T7 ve T7/Sp6) içeren primerler ile oluşturulan PCR ürünleri, RNA'ya kopyalanır. Hibridizasyon aşamasını takiben, birbirine uymayan RNA/kopya RNA ürünleri RNase tarafından birbirinden ayrılır. Test edilen örneklerdeki mutasyon sonucunda oluşan birbirine uymayan kısımlar, mutasyona uğramamış örneklerinkiler ile karşılaştırılır. Ürünler jel elektroforezde koşturulduktan sonra ethidium bromit ile boyanır. Oluşan bantlara göre, mutasyonun identifikasyonu yapılır (17).

PCR-RNA/RNA duplex RNase cleavage analizi için ticari kitler (Mutation Screener; Ambion, Inc., Austin, Tex. ) mevcuttur (16).

## 8. Silikon Mikroçiplerde DNA Oligonükleotit Dizileri

Gelişen yeni teknoloji, DNA prob sentezlerinin direkt olarak silikon mikroçiplerde yapılmasını mümkün hale getirmiştir. Günümüzde 50.000'in üzerinde oligonükleotit prob, direkt olarak bu çiplerde sentezlenmektedir.

HIV'de antivirallere karşı dirence yol açan mutasyonun saptanması için bu metot kullanılmaktadır. HIV RNA'sından reverse transkripsiyon ile cDNA elde edilir. cDNA dan transkripsiyon ile biotin ile işaretlenmiş RNA elde edilir. İşaretli RNA molekülleri direkt olarak silikon mikroçiplerde sentezlenen komplementer problara hibridize edilir. Son olarak bu hibridizasyon dizisinde, pozitif hibridizasyon sinyallerinin neden olduğu ışık tanır.

Antimikrobiyel dirence neden olan mutasyonun ya da direnç geninin hızlı bir şekilde saptanması için, matriks hibridizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Eğer spesifik bir mikroorganizmada meydana gelen antimikrobiyel direnç birden fazla gene ya da mutasyona dayanıyor ise bu tekniğin kullanılması öngörülmektedir. *M. tuberculosis*'te izoniasid direnci veya HIV'de reverse transkriptaz ya da proteaz inhibitörlerine karşı oluşan direnç, bu teknikle kolaylıkla saptanabilir(17).

## 9. Otomatik DNA Sekans Analizi

Bakteriyel suşların genomik DNA sekanslarının belirlenmesi için yapılan bir testtir. PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin sekanslarının direkt olarak belirlenmesi için floresan boya ile işaretli terminatörleri içeren otomatik DNA sekanslama prosedürü uygulanmaktadır. Bu yöntem ile 300-500bp'lik DNA fragmentleri 24 saat içinde belirlenebilir.

Amplifikasyon sonucunda elde edilen ürünlerinin identifikasyonunda, DNA sekanslama prosedürü "altın standart" olarak kabul edilmektedir (18). Prosedürün otomatizasyonu,

testin kullanımını daha cazip hale getirmiştir. Teknik daha hızlanmış ve maliyet azalmıştır. Son aşamada uygulanan elektroforez de kısmen otomatize edilmiştir. Musser ve ark. (18); yaptıkları bir çok çalışmada *M. tuberculosis*'teki çeşitli ilaçlara karşı oluşan dirence neden olan mutasyonun saptanması için DNA sekans analizini ana metot olarak kullanmışlardır.

Bu metodun, çoğu klinik laboratuvara adaptasyonu zordur. Analizin maliyeti laboratuvarlara göre farklılık göstermektedir. Fakat örnek başına ortalama maliyet 10\$ civarındadır. Ayrıca elektroforez ekipmanları ve otomatik DNA sekanser ( Model 373A ; applied Biosystems, Inco., Foster City, California) gerekmektedir (19).

## KAYNAKLAR

1. Kolbert, C.P., Arruda, J., Delmore, P.V., Zheng, X., Lewis, M., Kolberg, J., Persing, D.H. 1998. Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin resistant and oxacillin-sensitive Staphylococci. J. Clin. Microbiol., 36(9)2640-2644.
2. Patel, R., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill III, F.R. 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in Enterococci. J. Clin. Microbiol., 35 (3)703-707.
3. Rouse, D.A., Zhongming, L., Bai, G.H., Morris, S.L. 1995. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 39:2472-2477.
4. Felmlee, T.A., Liu, Q., Whelen, C., Williams, D., Sommer, S.S., Persing, D.H. 1995. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. J. Clin. Microbiol., 33(6)1617-1623.
5. Schwieger, F., Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-Single strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol., 64(12)4870-4876.
6. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T., Bodmer, T. 1993 Direct automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob. Agents Chemother., 37(10)2054-2058.
7. Marshall, D.J., Heisler, L.M., Lyamichev, V., Murvine, C., Olive, D.M., Ehrlich, G.D., Neri, B.P., Arruda, M.D. 1997 Determination of Hepatitis C virus genotypes in the United States by Cleavase Fragment Length Polymorphism Analysis. J. Clin. Microbiol., 35(12)3156-3162.
8. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. 1996 Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. Antimicrob. Agents Chemother., 40(4)1024-1026.

9. Brow, M.A., Oldenburg, M.C., Lyamichev, V., Heisler, M., Lyamichera, N., Hall, J.G., Eagen, N.J., Olive, D.M., Smith, L.M., Fors, L., Dahlberg, J.E. 1996 Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and *M. tuberculosis* katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. J. Clin. Microbiol., 34:2132-2139.
10. Piatek, A.S., Telenti, A., Murray, M.R., El-Hajj, H., Jacobs, W.R., Kramer, F.R., Alland, D. 2000. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons : implications for rapid susceptibility testing. Antimicrob. Agents Chemother., 44(1)103-110.
11. Tyagi, S., Kramer, F.R. 1996. Molecular Beacons : probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol., 14:303-308.
12. Tyagi, S., Marras, S.A.E., Jacqueline, A.M., Kramer, F.R. Molecular Beacons: hybridization probes for detection of nucleic acids in homogenous solutions. Erişim:[<http://www.molecular-beacons.org>] Erişim Tarihi: 15.08.2001.
13. Watterson, S.A., Wilson, S.M., Yates, M.D., Drobniowski, F.A. 1998 Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., 36(7)1969-1973.
14. Cooksey, R.C., Morlock, G.P., Glickman, S., Crawford, J.T. 1997 Evaluation of a Line Probe Assay Kit for characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. J. Clin. Microbiol., 35(5) 1281-1283.
15. Stuyver, L., Wyseur, A., VanArnhem, W., Hernandez, F., Maertens, G. 1996. Second-generation Line Probe Assay for Hepatitis C virus genotyping. J. Clin. Microbiol., 34(9)2259-2263.
16. Nash, K.A., Inderlied, C.B. 1996. Rapid detection of mutations associated with macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob. Agents Chemother., 40:1768– 772.
17. Güler, L. 1998. Mikrobiyal tiplendirme yöntemleri. Veterinarium ,9(1)82-91.
18. Musser, J.M., Kapur, V., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., VanSoolingen, D., Embden, J.D.A. 1996. Characterization of the catalase-peroxidase gene and inhA locus in isoniazid – resistant and – susceptible strains of *M. tuberculosis* by automated DNA sequencing. J. Infect. Dis., 173:196-202.
19. Kapur, V., Li, L.L., Iordunescu, S., Hamrick, M.R., Wanger, A., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene encoding the RNA polymerase beta subunit(rpoB) in rifampin -resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol., 32(4)1095-1098.