

VIM ve IMP Tipi Metallo Beta Laktamaz Genlerinin Hızlı Saptanması İçin Yeni Bir Multipleks PZR Metodu

A New Multiplex PCR Method for Rapid Detection of Genes Encoding VIM and IMP Types of Metallo Beta Lactamases

Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI,^a
Dr. Kenan MİDİLLİ,^a
Ghassan ISSA,^b
Dr. Özlem GÜVEN,^a
Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ,^a

^aMikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi,

^bBesin Hijyeni ve Teknolojisi AD,
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 26.02.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 04.09.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
obasmaci@istanbul.edu.

ÖZET Amaç: Bu çalışmada VIM ve IMP tipi metallo beta-laktamazları (MBL) kodlayan genlerin tamamını hızlı şekilde saptayacak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü tarif edilmiştir. Ayrıca bu yöntem İstanbul'da büyük bir üniversite hastanesinde izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinde MBL varlığı ve tiplerinin araştırılmasında kullanılmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** bla IMP1-22 ve blaVIM1-12 prototip sekansları GenBank'tan indirilmiş ve Bioedit bilgisayar paketinden ClustalW multipl alignment programı kullanılarak hizalanmıştır. Farklı primer konsantrasyon ve oranlarının kullanıldığı optimizasyon deneylerinden sonra en uygun multipleks PCR formatı 1:2 VIM / IMP olarak belirlenmiş ve tüm tarama testlerinde bu format kullanılmıştır. Multipleks PCR yöntemi imipenem dirençli veya orta dirençli 51 adet *P.aeruginosa* kökeninde de kullanılmıştır. İmipenem, meropenem, seftazidim ve sefepim için minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) agar dilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Kontrol kökenleri olarak IMP-1, IMP2, IMP13, VIM1, VIM2, VIM4 tipi enzimleri üreten *P.aeruginosa* kökenleri ve VIM-5 tipi enzim üreten *K.pneumoniae* kökeni kullanılmıştır. **Bulgular:** Tüm kontrol kökenleri belirtilen multipleks PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Elli bir adet *P.aeruginosa* kökeninde multipleks PCR yöntemi ile blaIMP ve blaVIM varlığı saptanmıştır. İmipenem, meropenem, seftazidim ve sefepim için MİK50 değerleri sırasıyla 32µg/ml, 32µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml olarak bulunmuştur. **Sonuç:** Bu çalışmada belirtilen multipleks PCR protokolü IMP ve VIM tipi MBL genlerinin çeşitli klinik birimlerde epidemiyolojik yayılımlarını incelemek amacıyla kullanılması faydalı olabilecek bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*; PCR; karbapenemler; beta-laktamazlar

ABSTRACT Objective: This study describes a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay protocol for rapid detection of genes encoding VIM and IMP types of metallo beta lactamases (MBL). This assay is also used for evaluate the presence and types of MBL among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a large university hospital in Istanbul. **Material and Methods:** bla IMP1-22 and blaVIM1-12 prototype sequences were downloaded from GenBank and aligned using ClustalW multiple alignment program in Bioedit software package. Following optimisation using different concentrations and combination of primers, the 1.2 VIM/IMP ratio for primers were determined and used throughout the screening assays. The multiplex PCR protocol was used to screen 51 *P.aeruginosa* isolates resistant or intermediate resistant to imipenem. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of imipenem, meropenem, ceftazidime and cefepime were determined by the agar dilution method. Control strains comprised of *P.aeruginosa* strains producing IMP-1, IMP-2, IMP-13, VIM-1, VIM-2, VIM-4 and a *Klebsiella pneumoniae* strain producing VIM-5. **Results:** The multiplex PCR method was able to detect all the control strains producing VIM and IMP types of MBL genes. No isolate was found to be positive for blaVIM and blaIMP genes among 51 *P.aeruginosa* isolates with the multiplex PCR method. MIC50 values for *P.aeruginosa* isolates of imipenem, meropenem, ceftazidime and cefepime were 32µg/ml, 32µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, respectively. **Conclusion:** The multiplex PCR assay described in this study could be helpful for monitoring the epidemiology of VIM and IMP types of MBL in different clinical settings.

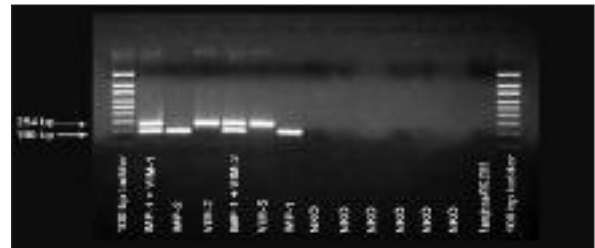
Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*; polymerase chain reaction; carbapenems; beta-lactamases

P*seudomonas aeruginosa* birçok farklı direnç mekanizmasına sahip önemli bir hastane enfeksiyonu etkenidir. Karbapenemler *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında sık olarak kullanılan seçkin bir antibiyotik grubudur. Metallo-beta-laktamazlar (MBL) karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumlu mekanizmalardan birisidir. MBL *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve *Enterobacteriaceae* üyelerinde gittikçe artan bir sıklıkla bildirilmektedir. *P.aeruginosa*'da VIM ve IMP tipleri en sık rastlanılan MBL'dir. IMP ve VIM tipi MBL sıklıkları dünyanın birçok bölgesinde değişen oranlarda bildirilmektedir.¹ Günümüzde IMP tipi MBL'ın sayısı 20'yi aşmış durumdadır, VIM tipi MBL ise 12 farklı tipe ulaşmıştır (<http://lahey.org.studies>). Bu çok sayıdaki VIM ve IMP tipi MBL'ı saptamak ve karakterize etmek birçok laboratuvar için oldukça zahmetli, pahalı ve zaman alıcıdır. Bu çalışmada farklı IMP ve VIM tipi allellerin tamamını kısa zamanda, oldukça ucuz ve pratik şekilde saptayacak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tarif edilmektedir ayrıca bu yeni geliştirilen multipleks PCR yöntemi ile İstanbul'da büyük bir üniversite hastanesinde izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinde MBL varlığı ve sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Prototip sekanslara ait GenBank erişim numaraları <http://lahey.org.studies> web adresinden elde edilmiştir. bla IMP1-22 ve blaVIM1-12 prototip sekansları GenBank'tan (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD) indirilmiş ve Bioedit bilgisayar paketinden ClustalW multipl alignment programı kullanılarak hizalanmıştır. PanVIM ve PanIMP primer çiftleri manuel olarak tasarlanmıştır. Tasarlanılan ve kullanılan primer çiftleri bla VIM F 5'-TT CTC GCG GAG ATT GAR AAG C-3', bla VIM R 5'-TTG TCG GYY GAA TGC GCA GC-3', bla-IMP F 5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3', blaIMP R 5'-AR CCA AAC YAC TAS GTT ATC-3' şeklindedir. IMP ve VIM için öngörülen amplicon büyüklükleri sırasıyla 190bp ve 264bp'dir (Resim 1). VIM-7 tipi enzim üreten bakteriler için beklenen amplicon büyüklüğü ise 261bp'dir.

DNA ekstraksiyonları high pure templatation preparation kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon ve tarama testlerinde pozitif kontrol kökenleri olarak VIM-1, VIM-2, VIM-4, IMP-1, IMP-2, IMP-13 tipi enzimleri üreten *P.aeruginosa* kökenleri ve VIM-5 tipi enzim üreten *K.pneumoniae* suşları kullanılmıştır. Negatif kontrol kökeni olarak ise *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Optimizasyon aşamasında VIM ve IMP primerleri farklı oranlarda kombine edilerek tek VIM/IMP ya da VIM+IMP pozitiflikleri durumlarında en iyi sonuç veren VIM/IMP oranları belirlenmiştir. Optimizasyon deneylerinden sonra en uygun multipleks PCR formatı 1:2 VIM / IMP (primer oranı) olarak belirlenmiştir ve tüm tarama testlerinde bu format kullanılmıştır. Her suş için yapılan multipleks PCR reaksiyonu blaVIM ve blaIMP primerlerini içeren tek bir reaksiyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. Primerlerin Tm'leri (erime sıcaklıkları) Primer Express (Applied Biosystems, CA, ABD) programı kullanılarak saptanmıştır. PCR döngüsü için amplifikasyon programı başlangıç denatürasyonu 95°C'de 2 dakika, 95°C'de 30 saniye, 52°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika olmak üzere olmak üzere 40 döngü ve son olarak 72°C'de 5 dakika polimerizasyon süresi olarak düzenlenmiş ve tüm testlerde kullanılmıştır. İnhibitör varlığını dışlamak için ayrı bir seansta aynı ekstraksiyonlar kullanılarak tüm örneklerde 16S rDNA üniversal primerler (bla16S-8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', bla16S-1493R 5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3') kullanılarak bakteri DNA'sı varlığı araştırılmıştır. PCR ürünleri etidyum bromür içeren agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV-transilüminatör ile görüntülenmiştir. Ürünler standart

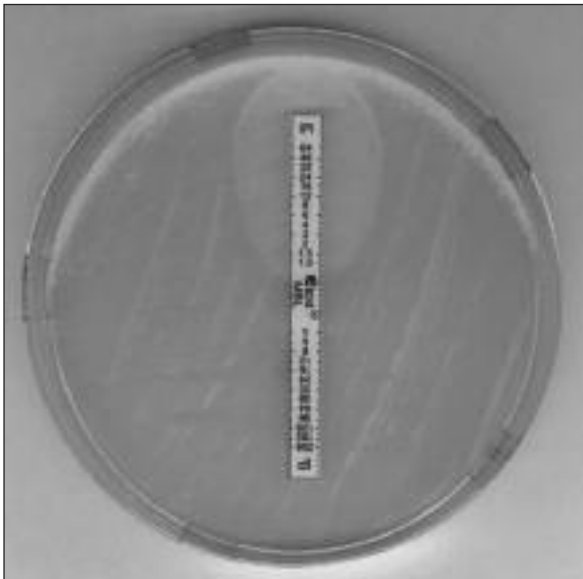


RESİM 1: VIM ve IMP tipi metallo beta-laktamazlar için kontrol kökenleriyle yapılan multipleks PCR (NKÖ: Negatif klinik örnek).

DNA size marker (GeneRuler 100bp DNA ladder, Fermentas, Litvanya) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2005-2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ayrı hastalardan izole edilmiş, imipeneme dirençli veya orta dirençli 51 adet *P.aeruginosa* kökeni incelenmiştir. Elli bir hastanın 37'si erkek, 14'ü ise kadındır. Örneklerin çoğunluğu idrar, kan, abse ve yara sürüntüsü örneklerinden izole edilmiştir. Kökenler pigment oluşumu, oksidaz pozitifliği ve 42°C'de üreyebilme özellikleriyle tanımlanmıştır.

Suşların imipenem, meropenem, seftazidim ve sefepime karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Clinical and Laboratory Standarts Institute standartlarına uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.² Fenotipik olarak MBL üretimi imipenem-imipenem EDTA E-test (AB Biodisk, Sonla, İsveç) şeritleriyle saptanmıştır. E-test fenotipik yöntemi için pozitif kontrol kökeni olarak *P.aeruginosa* VIM-2 (Resim 2), negatif kontrol kökeni olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. İmipenem/İmipenem EDTA MİK oranının üç dilüsyon azalması, olası MBL pozitifliği olarak belirlenmiştir.³



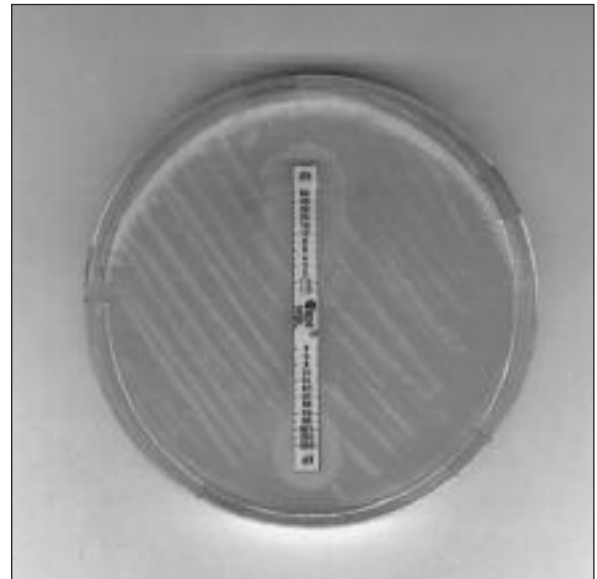
RESİM 2: E-test fenotipik yöntemi için pozitif kontrol kökeni *P.aeruginosa* VIM-2.

SONUÇLAR

Çeşitli dilüsyonlar ve VIM, IMP tipi primerlerin farklı oranlarını içeren optimizasyon çalışmalarından sonra tüm kontrol kökenleri ile pozitif PCR sonuçları elde edilmiştir. Öte yandan 51 adet imipeneme dirençli veya orta dirençli kökenin tamamı da tarif edilen multipleks PCR yöntemi ile taranmış ve hiçbir kökende blaVIM ve blaIMP varlığı saptanmamıştır. Elli bir *P.aeruginosa* kökeninin 45'inde imipenem direnci bulunurken altı tanesi orta dirençli olarak bulunmuştur. Bu kökenlerin imipenem, meropenem, seftazidim, sefepime karşı MİK50 değerleri sırasıyla 32µg/ml, 32µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml olarak bulunmuştur. Fenotipik olarak olası MBL varlığı 11 adet kökende belirlenmiştir (Resim 3). Ancak hem EDTA ile MİK değerleri değişen 11 adet kökende, hem de EDTA'dan etkilenmeyen 40 kökende MBL varlığı saptanmamıştır. Örneklerin tümünde 16S rDNA pozitif bulunduğu için hiçbirinde inhibitör varlığı saptanmamıştır.

TARTIŞMA

MBL diğer birçok beta-laktamazlar gibi kromozomal veya aktarılabılır olarak basitçe ikiye ayrılabilir. Aktarılabılır özellikte olan MBL genellikle



RESİM 3: E-test fenotipik yöntemi ile pozitif bulunan klinik *P.aeruginosa* kökeni.

integronlar içerisinde gen kasetleri şeklinde bulunmaktadır ve bu MBL genleri sıklıkla plazmidler bazen de transpozonlar vasıtasıyla mikroorganizmalar arasında hareket edebilirler. Bu genler farklı düzeylerde karbapenemlere direnç sağlamaktadırlar. Bu direncin düzeyinde kuşkusuz dış membran değişiklikleri, pompa gibi farklı mekanizmalar da rol oynamaktadır.^{1,4} Ülkemizden ilk olarak bildirilen MBL, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinde, bir *K. pneumoniae* kökeninde saptanan VIM-5 tipi MBL'dır (Gen accession no: AY144612). Yine *K.pneumoniae* kökenlerinde IMP-1 ve VIM-1 tipi MBL sırasıyla İstanbul ve Ankara'dan bildirilmiştir.^{5,6} MBL'in başta plazmid, transpozon gibi elemanlarla aktarılabildiği özellikleri düşünüldüğünde, İstanbul'da iki büyük üniversite hastanesinde *Enterobacteriaceae* üyelerinden saptanmasından sonra nonfermentatif Gram negatif çomaklarda da saptanması beklenebilirdi ancak çalışmamızda *P.aeruginosa* kökenlerinde MBL varlığı saptanmamıştır. Aynı şekilde İstanbul Tıp Fakültesinde son yıllarda yapılan bir çalışmada *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. kökenlerinde IMP ve VIM tipi MBL belirlenmemiştir.⁷ Bu bilgilere dayanarak MBL'in İstanbul Üniversitesine bağlı iki büyük üniversite hastanesinde yaygın olarak bulunmadığı söylenebilir. Bunların dışında ülkemizde çeşitli bölgelerden MBL üreten kökenler bildirilmiştir. Örneğin Trabzon'da Karadeniz Teknik Üniversitesi Hastanesinden izole edilen *P.aeruginosa* kökenlerinin %9'unda IMP-1, %1'inde VIM tipi MBL saptanmıştır.⁸ *P.aeruginosa* kökenlerinde VIM2, VIM5 tipi MBL Ankara'dan ve Elazığ'dan bildirilmiştir.^{9,10} Diyarbakır'dan 2002 yılından önce izole edilen bir *Enterobacter cloacae* kökeninden VIM-5 tipi MBL izole edilmiştir.¹¹

Son zamanlarda birçok önemli Gram negatif bakteride MBL saptanma sıklıkları ve tipleri hızla artmaktadır. Örneğin; başlangıçta sadece Japonya'ya ve bazı Uzak Doğu Asya ülkeleriyle sınırlı olduğu düşünülen IMP tipi MBL birçok farklı ülkeden bildirilmiş ve IMP tipi MBL'in sayısı günümüzde 20'yi aşmıştır. Aynı şekilde IMP tipi MBL'in Avrupa'da endemik şekli olarak gösterilen VIM tipi MBL geniş bir coğrafyaya yayılmakla kalmamış, 12 farklı VIM tipi MBL tanımlanmıştır.^{1,4} Çalışmamızda tüm bu farklı IMP ve VIM tipi MBL'in bir seferde saptanabildiği multipleks PCR yöntemi belirtilmiştir. Bu yöntem oldukça hızlı, ucuz ve az zaman alan bir yöntemdir. Sadece tek bir reaksiyonla panVIM ve panIMP MBL genleri saptanabilmektedir. Aynı şekilde IMP ve VIM tipi MBL'i pratik şekilde tanımayaya yönelik multipleks real time PCR yöntemleri dünyanın değişik bölgelerinden tarif edilmektedir.^{12,13} Bu çalışmada belirtilen multipleks PCR protokolü elimizde bulunan tüm MBL ekspres eden kökenleri başarıyla saptamıştır. Maalesef tüm farklı MBL'i ekspres eden bakteri kökenleri elimizde bulunmamaktadır, aynı zamanda ileride tarif edilecek yeni IMP ve VIM varyantları için primer diziliminde düzenlemeler gerekebileceği de bir gerçektir. Günümüzde çoğul dirençli bakterilere karşı elimizde bulunan en önemli silahlardan olan karbapenem grubu antibiyotikleri tehdit eden MBL'i hızlı bir şekilde saptayabilmek kuşkusuz bu tip enzimlerin etkilerini azaltmakta faydalı olacaktır. Bu çalışmada belirtilen multipleks PCR protokolü IMP ve VIM tipi MBL'in çeşitli ünitelerdeki yayılımlarını incelemek amacıyla kolaylıkla kullanılacak bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

- Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21(4):367-71.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Testing. 17th informational supplement (M100-S17). Wayne, PA: CLSI; 2007. p.38-9.
- Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2755-9.
- Queenan AM, Bush K Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-582.
- Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(7):695-6.
- Yıldırım I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 2007;19(4):467-8.
- Aktaş Z, Kayacan CB. Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis* 2008;40(4):320-5.

8. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksali I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist* 2007;13(3):191-8.
9. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(1):282-3.
10. Yakupogullari Y, Poirel L, Bernabeu S, Kizirgil A, Nordmann P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(1):221-2.
11. Gacar GG, Midilli K, Kolayli F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, et al. Genetic and enzymatic properties of metallo-beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(10):4400-3.
12. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):544-7.
13. Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S. Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo-beta-lactamase genes in a single real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(12):1201-3.