

SPİNAL KORD YARALANMALI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli* SUŞLARININ RANDOM AMPLİFİYE POLİMORFİK DNA-PCR (RAPD) YÖNTEMİ İLE GENETİK ANALİZİ

Dr. Abdullah KILIÇ(*), Dr. Mehmet YAPAR(*), Dr. Mehmet Ali SARAÇLI(*),
Dr. Mehmet BAYSALLAR(*), Dr. Levent DOĞANCI(*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (2) : 143 - 146 (2003)

ÖZET

Spinal kord yaralanması (SKY) nedeniyle yatan hastaların idrarlarından hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen çoklu antibiyotik dirençli *Escherichia coli* suşlarının Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile birbirlerine olan genetik yakınlıkları ve yöntemin uygulanabilirliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Klasik yöntemlerle tanımlanmış olan suşlara 17 antibiyotik için duyarlılık testi yapılmıştır. Çalışmaya alınan 61 suşun 32 (%52.4)'sinin birden fazla antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu 32 suş RAPD yöntemi ile genotiplendirilmiştir. Elde edilen bant paternleri ile suşların SPSS 10.0 programında dendrogramları çıkarılmış ve birbirlerine olan genetik yakınlıkları tespit edilmiştir. Buna göre *E.coli* suşları 12 gruba ayrılırken en geniş grupta altı ve üç grupta da birer suş yer almıştır. Sonuç olarak, *E.coli* suşlarının genetik olarak birbirlerinden farklı oldukları ve tek kaynaktan köken almadıkları görülmüş, RAPD-PCR yönteminin epidemiyolojik araştırmalarda uygulanması kolay ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Spinal Kord Yaralanması, RAPD, *Escherichia coli*.

SUMMARY

Genetic Analysis of *Escherichia coli* Strains Isolated From Patients With Spinal Cord Injury by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD) Method

It was aimed to find out the genetic relationship between multipl antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated as nosocomial agents from uriners of patients with spinal cord injury by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD) and the practicability

of this method. The strains identified by convantional methods were performed antimicrobial susceptibility testing for 17 kinds of antibiotic. 32 of 61 (52.4 %) strains were resistant to more than one antibiotic. Those of 32 strains were genotyped by RAPD method. Dendrogram of the strains has been performed on SPSS 10.0 program by using the band patterns and genetic relationship of them was determined. While having six strains in the most extensive group and three groups with only one strains, *E.coli* strain were described in 12 groups. As regard to genetic differences it was concluded that *E.coli* strains were not originated from sole source and RAPD was an easy and rapid method for epidemiological researches.

Key Words: Spinal Cord Injury, RAPD, *Escherichia coli*.

GİRİŞ

Spinal kord yaralanması (SKY) sonrası hastaların hastanelerde uzun süre tedavi görmeleri nozokomiyal infeksiyonların daha sık ortaya çıkmasına yol açmaktadır (1,2). Bu tür hastalarda idrar akım dinamiği bozulduğundan üriner sistem infeksiyonları büyük bir sorun oluşturmaktadır (1).

Üriner sistem infeksiyonlarının %95'ten fazlasına tek bir mikroorganizma neden olmaktadır. *Escherichia coli* bu tür infeksiyonlarda en sık izole edilen bakteridir. Devamlı kateterli hastalarda gelişen hastane kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarında yayılma çapraz infeksiyon ile olmaktadır. Hastaların kateter kullanmaları ve sık olarak antibiyotiğe maruz kalmaları dirençli mikroorganizmalar ile oluşan infeksiyon oranını artırmaktadır (3).

Epidemiyolojik araştırmalarda *E.coli* suşlarının tiplendirilmesi ve tanımlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Benzer antibiyotik direnç profili gösteren suşlar farklı genotipik patern gösterebilecekleri gibi, benzer direnç profiline sahip olmayan suşlar da genetik olarak aynı olabilirler. Antibiyotik duyarlılık test analizine bağlı yöntemler genel olarak epidemiyolojik tiplendirmelerde yetersiz kalmaktadırlar. Günümüzde tiplendirme için daha çok moleküler

(*) GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
Reprint Request: Dr. Abdullah KILIÇ, GATA Mikrobiyoloji AD. 06018, Etlik /ANKARA
Kabul Tarihi: 25.03.2003

yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) *E.coli* suşlarının genotiplendirilmesinde başarı ile kullanılmaktadır (4,5,6). RAPD ile tiplendirme nispeten basit, az maliyetli, kısa sürede sonuçlandırılabilir olması, PCR gibi basit bir test temelinde bağlı olması ve fazla sayıda örneği hızlı analiz etmesi ile önemli avantaj sağlamaktadır (7,8).

RAPD yönteminde primer olarak rasgele dizayn edilmiş kısa (10-15 bazlık) oligonükleotid zinciri kullanılır. Kısa primer, analizi yapılacak DNA kalıbının her iki zincirinin de farklı yerlerine yapışabilir. Reaksiyon sonucunda, bu farklı yapışmalardan dolayı farklı uzunluklarda ürünler ortaya çıkar. Analizi yapılan genomik kalıplar arasında farklılıklar varsa primerlerin yapışma yerleri değişeceğinden agaroz jel üzerinde farklı büyüklükte bantlar görülecektir. Bu yöntemin RFLP gibi diğer DNA tiplendirme tekniklerinden daha duyarlı olduğu ve *E.coli* 'yi de içine alan çeşitli mikroorganizmaların karakterize edilmesinde başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir (9).

Çalışmada, TSK Rehabilitasyon ve Bakım Merkezi'nde SKY nedeniyle yatan hastaların idrarlarından hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *E.coli* suşlarının RAPD yöntemi ile birbirlerine olan genetik yakınlıkları ve yöntemin uygulanabilirliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Testi: İdrar örnekleri %5 koyun kanlı agar ve eosin methylene blue (EMB) agar'a kantitatif yöntemle ekildi (10). Ekimler aerobik koşullarda 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İzole edilen mikroorganizmalar klasik yöntemlerle tanımlandı (11). Tanımlanan bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri, 17 antibiyotik için, National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) kriterlerine uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile ticari antibiyotik diskleri (Oxoid-France) kullanılarak yapıldı (12). Birden fazla antibiyotiğe dirençli olan suşlar çalışmaya alındı.

DNA İzolasyonu: *E.coli* hücreleri 10 ml LB Broth besiyerinde 12-16 saat süreyle 37°C'lik etüvde inkübe edildi. Daha sonra Sambrook ve arkadaşlarının tanımladığı alkali lizis metoduna göre DNA izolasyonu gerçekleştirildi (13).

PCR: Toplam miktarı 30 µl olan PCR karışımı, içinde 10 µl bakteri DNA süspansiyonu, 50 pmol M13 primeri (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), 2IU Taq polimeraz (Fermentas/Almanya), 4 µl MgCl₂ (25mM), 5 ml 10X enzim tamponu, 2 µl dNTP (10mM) olacak

şekilde hazırlandı. Bu karışım her döngü 94°C'de 1 dakika, 36°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngüye tabi tutuldu (14). Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutuldu (150 Volt, 30 dakika). Elektroforez sonunda jel etidyum bromidle boyandı ve GelDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad-USA) ile görüntüledi.

İstatistiksel analiz: Bant büyüklükleri Quantity One (Bio-Rad, USA) kullanılarak hesaplandı ve bu veriler kullanılarak SPSS 10.0 (SPSSFW,SPSS Inc.,USA) programıyla kümeleme analizi (cluster analizi) yapıldı, dendrogram elde edildi (15).

BULGULAR

Antibiyotik duyarlılık testi için 17 antibiyotik işleme alındı. Çalışmaya alınan 61 suşun 32 (%52.4) 'sinin birden fazla antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edildi. Bu 32 suş RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirildi. Elde edilen bant paternlerine göre suşların birbirlerine olan genetik yakınlıkları tespit edildi (Şekil 1). Buna göre *E.coli* suşlarının 12 gruba ayrıldığı, en geniş grupta altı ve üç grupta da birer suşun yer aldığı görüldü (Şekil 2).

TARTIŞMA VE SONUÇ

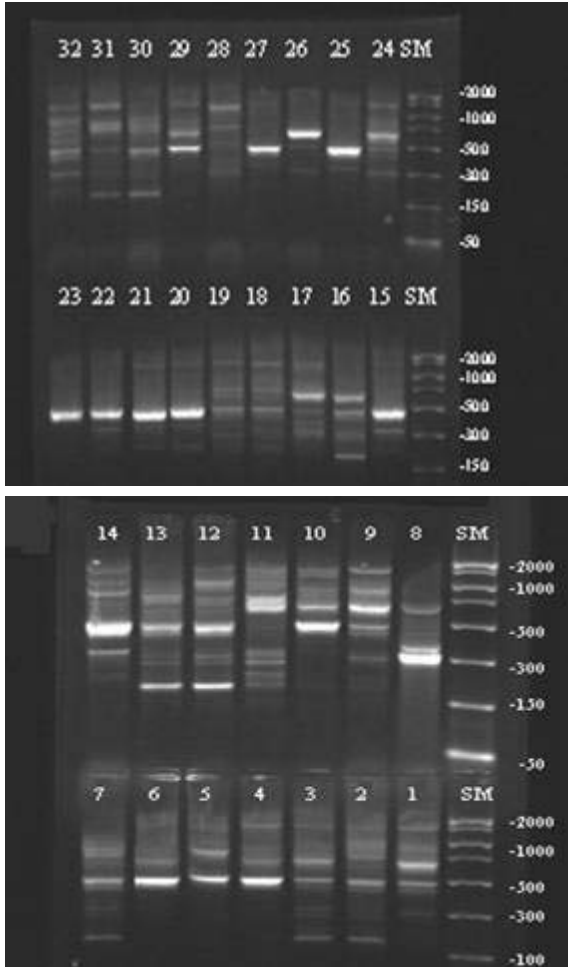
Enterobacteriaceae'lar gastrointestinal sistem florasının doğal üyeleridir. Ayrıca üriner sistemde sık olarak infeksiyona neden olmaktadır. *E.coli*, komplike olmayan üretritten semptomatik sistite kadar üriner sistem infeksiyonuna en sık neden olan bakteridir (3,16).

Üriner sistem infeksiyonları, nozokomiyal infeksiyonlar arasında önemli bir yere sahiptir ve kazanılan infeksiyonların %40'ını oluşturmaktadır. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'ndeki akut bakım hastanelerinde tahminen 400.000-1.000.000 hastada nozokomiyal bakteriüri veya üriner sistem infeksiyonu gelişmektedir. Özellikle hastaların rehabilitasyon merkezlerinde olması ve kateter kullanması bu oranı arttırmaktadır (17).

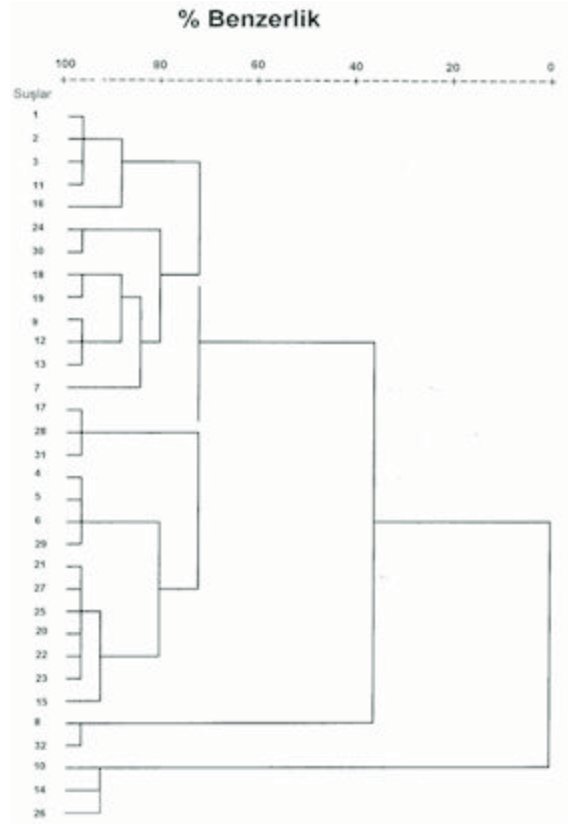
Epidemiyolojik çalışmalarda çoğu laboratuvarlarda değişik tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler nispeten daha zayıf ayırıcı gücüne sahiptirler. Diğer genotiplendirme yöntemlerinden nispeten basit ve hızlı olması RAPD tiplendirme yöntemine avantaj sağlamaktadır (8). Basit ve hızlı bir yöntem olduğundan özellikle geniş epidemiyolojik çalışmalarda ve hastane salgınlarında bakteri türlerinin hızlı bir şekilde karşılaştırılmasını sağlamaktadır (6). Pacheco ve ark.(18) enterotoksijenik *E.coli*'ler üzerinde yaptıkları çalışmada, RAPD

yönteminin, genetik benzerlikleri göstermede büyük katkı sağladığını vurgulamışlardır. Gougeon ve ark. (19) RAPD yönteminin, taksonomik ve filogenetik olarak organizmalar arasındaki ilişkinin tanımlanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Chansiripornchai ve ark. (20) *E.coli* ile oluşan enfeksiyonlarla ilgili epidemiyolojik çalışmalarında, RAPD yönteminin basit, düşük maliyetli ve hızlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Birch ve ark (7) çalışmalarında, RAPD yönteminin, diğer tiplendirme yöntemlerine göre hız ve basitlik avantajına sahip olduğunu ve ayrıca DNA ekstraksiyon ve pürifikasyon işlemlerinin hızlı olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, merkezimizde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve birden fazla antibiyotiğe dirençli olan *E.coli* suşlarının tek bir kaynaktan köken almadıkları görülmüştür. Ayrıca RAPD yönteminin moleküler biyoloji laboratuvarlarında uygulanmasının basit olduğu, kısa sürede sonuç alma ve yorumlanmanın kolay olmasının özellikle epidemiyolojik amaçlı çalışmalarda bu yöneme olan ilgiyi arttıracakı düşünülmektedir.



Şekil-1: RAPD agaroz jel görüntüsü SM: Size marker



Şekil-2: Suşların Dendrogram Grafiği

KAYNAKLAR

1. Montgomerie, J.Z.: Infection in Patients with Spinal Cord Injuries. *Clin Infect Dis*;25:1285-1292,1997.
2. Waites, K.B., Canupp, K.C., Devivo, M.J.: Phagocytosis of Urinary Pathogens in Persons With Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil*;75:63-66,1994.
3. Sobel, J.D., Donal, K.: Urinary Tract Infection. Eds.: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th Edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, pp 773-805
4. Ramsoota, P., Krovacek, K., Chansiripornchai, N., Mörner, A.P., Svenson, S.B.: Identification of *Escherichia coli* Recovered from Milk of Sows with Coliform Mastitis by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Using Standardized Reagents. *Acta Vet Scand*;41(3):249-259, 2000.
5. Maurer, J.J., Lee, M.D., Lobsinger, C., Brown, T., Maier, M., Thayer, S.G.: Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Avian Dis*;(42):431-451, 1998.

6. Cavé, H., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E.: Differentiation of *Escherichia coli* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Res Microbiol*;145:141-150, 1994.
7. Birch, M., Denning, D.W., Law, D.: Rapid Genotyping of *Escherichia coli* O157 Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*;15(4):297-302, 1996.
8. Osek, J.: Genetic Diversity Among *Escherichia coli* O149:K91 strains isolated From Pigs With Diarrhoea Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Research in Veterinary Science*;67(2):197-198, 1999.
9. Pacheco, A.B.F., Guth, B.E.C., Almeida, D.F., Ferreira, L.S.C.: Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Res Microbiol*;147(3):175-182, 1996.
10. Bilgehan, H.: Enterobacteriaceae. Eds.: Bilgehan, H.: *Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2 nci Baskı, İzmir, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1995, s.425-50*
11. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C.: *Guidelines for the Collection, Transport, Processing, Analysis, and Reporting of Cultures From Specific Specimen Sources. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition, Philadelphia, JB Lippincott Co, 1997, pp 121-162*
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performans Standarts for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Sixth Edition. Approved Standart M2-A6 1996; Vol 17 No.1, NCCLS.*
13. Sambrook, J., Fritsch, E.H., Maniatis, T.: *B16 Preparation of Reagents and Buffers Used in Molecular Cloning. Molecular Cloning. 2nd edition, New York, CSH, 1989, pp 14.5-14.30*
14. Jones, C., Kortenkamp, A.: *RAPD Library Fingerprinting of Bacterial and Human DNA: Applications in Mutation Detection. Teratog Carcinog Mutagen*; 20(2): 49-63, 2000.
15. Wolf, K., Rijini, J.: Rapid detection of genetic variability in *Chrysanthemum* using random primers. *Heredity*;71:335-341, 1993.
16. Eisenstein, B.L., Zaleznik, D.F.: *Enterobacteriaceae, Eds.: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, pp 2294-2310*
17. Garibaldi, R.A.: *Hospital-Acquired Urinary Tract Infections, Eds.: Richard P Wenzel. Prevention and Control of Nosocomial Infections. 2nd edition, Baltimore USA, Williams&Wilkins, 1993, pp 600-613*
18. Pacheco, A.B.F., Guth, B.E.C., Almeida, D.F., Ferreira, L.S.C.: Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. *Res Microbiol*;147:175-182, 1996.
19. Gougeon, A.J., Jobert, S.D., Shacoori, Z.T., Ménard, C., Cormier, M.: Osmotic Stress-Induced Genetic Rearrangements in *Escherichia coli* H10407 Detected by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl Environ Microbiol*;66(12):5484-5487, 2000.
20. Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B.: Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol*;80:75-83, 2001.