

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN (PVL) VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF PANTON-VALENTIN LEUCOCIDIN (PVL) IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Hilal ÖZKUL¹, İ. M. Ali Öktem¹, Zeynep GÜLAY¹

ÖZET: *Staphylococcus aureus* suşlarında bulunabilen Panton-Valentin lökositidin (PVL), lökositler ve diğer hücreleri parçalayarak doku nekrozuna yol açan bir sitotoksindir. PVL son yıllarda toplum kökenli metisiline dirençli *S.aureus* suşlarında bulunması ile gündeme gelmiştir. Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 2005-2006 yıllarında klinik örneklerden izole edilmiş metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus* (sırasıyla MSSA ve MRSA) suşlarında PVL varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya Ocak 2005- Mayıs 2006 tarihleri arasında kan, yara ve solunum yolu örneklerinden üretilmiş izolatlar arasından rasgele seçilen 55 MRSA ve 79 MSSA suşu alınmıştır. PVL varlığı hem *pvl* (*luk*) hem de *S.aureus* için özgül *nuc* genlerinin saptandığı bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre hastanemizdeki MRSA izolatlarının hiçbirisinde PVL varlığı saptanmamış, buna karşın 2005 yılına ait 40 MSSA suşunun ikisinde (%5) ve 2006 yılına ait 39 MSSA suşunun dördünde (%10.3) PVL pozitifliği belirlenmiştir. Bu sitotoksin, MSSA izolatlarında da çok yaygın olmamakla birlikte, 2006 yılındaki prevalansın 2005 izolatlarına kıyasla iki kat fazla olması ve PVL pozitif altı izolatın dördünün (%66.7) genel cerrahi servis veya polikliniğindeki hastalardan izole edilmiş olması dikkat çekici bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Panton-Valentin lökositidin (PVL), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA), multipleks PCR.

ABSTRACT: Panton-Valentin leucocidin (PVL) is a cytotoxin which causes tissue necrosis by degrading leucocytes and other cell types. PVL has recently become very up to date as it has been shown to be the major virulence factor of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. In this study, the presence of PVL was investigated in methicillin sensitive and resistant *S.aureus* (MSSA and MRSA, respectively) strains which were isolated from clinical samples between January 2005- May 2006 at Dokuz Eylul University Hospital, Izmir. Fifty five MRSA and 79 MSSA strains which were isolated from blood, wound and respiratory tract samples were randomly included to the study. The presence of PVL was evaluated by multiplex polymerase chain reaction (PCR) which detects *pvl* and *S.aureus*-specific *nuc* genes. As a result, PVL positivities were detected in two (5%) of 40 MSSA and four (10.3%)

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (zeynep.gulay@deu.edu.tr)

of 39 MSSA strains isolated in the years 2005 and 2006, respectively. None of the MRSA isolates had *pvl* gene. Although this cytotoxin was rarely detected among MSSA isolates, it was interesting to note that the prevalence of PVL was twice more in the year 2006 compared to 2005. It was also worth to notify that four of six (66.7%) PVL positive strains had been isolated from the patients of general surgery inpatient or outpatient clinics.

Key words: *Panton-Valentin leucocidin (PVL)*, *methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, *methicillin sensitive S.aureus (MSSA)*, *multiplex PCR*.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, virülans faktörlerine bağlı olarak insanda deri enfeksiyonlarından septisemiye kadar değişen pek çok hastalık tablosuna yol açabilen bir patojendir¹. *S.aureus*'un virülans faktörlerinden olan Panton-Valentin lökositin (PVL), insan polimorfonükleer hücreleri ve lökositler üzerindeki özgül litik aktivitesiyle por oluşturarak lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna yol açan bir sitotoksindir^{2,3}. PVL'yi kodlayan genler, Prevost ve arkadaşlarının⁴ yaptığı çalışmada klonlanıp, sekanslanarak *lukS-PV* ve *lukF-PV* olarak adlandırılmıştır. *lukS-PV* geni 28 aminoasitlik bir sinyal dizisi içeren 312 aminoasitten oluşan bir polipeptid, *lukF-PV* geni ise 24 aminoasitlik bir sinyal dizisi içeren 325 aminoasitten oluşan bir polipeptid kodlamaktadır⁴. PVL genleri Φ SLT fajı üzerinde taşınmaktadır¹.

Coğrafi bölgeye ve çalışılan suşların özelliklerine göre değişmekle birlikte, klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarının %5'inden daha azı *pvl* taşımaktadır^{3,5,6}. Bunların çoğu metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarıdır. Ancak son yıllarda, PVL üreten metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarının ağır nekrotik deri lezyonları ve nekrotizan pnömoni ile seyreden toplum kökenli enfeksiyonlarla ilişkili olduğu saptanmıştır¹.

Ülkemizde *S.aureus* suşlarının PVL üretimi ile ilgili herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, 2005-2006 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde izole edilen MRSA ve MSSA suşlarında *pvl* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Çalışmaya, Ocak 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen kan, yara ve solunum yolu örneklerinden üretilen izolatlar arasından rasgele seçilen 55 MRSA ve 79 MSSA suşu alındı. *pvl* pozitif kontrol suşu (LY 1999 0053) Prof. J. Etienne (Fransa) tarafından sağlandı.

DNA Eldesi: Bakterilerden DNA eldesi için akromopeptidaz ekstraksiyon yöntemi kullanıldı⁷. Kısaca, steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µl NET tamponu (10 mM Tris+1 mM EDTA+10 mM NaCl) ve 10 µl akromopeptidaz (10 units/µl-A3547) çözeltisi konularak, karışım içerisine 2-3 adet *S.aureus* kolonisi eklendi. Tüpler 50°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde 30 dakika bekletilerek ekstraksiyon gerçekleştirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): PVL varlığı hem *pvl* (*luk*) hem de *S.aureus* için özgül *nuc* genlerinin saptandığı bir multipleks PCR yöntemi ile değerlendirildi. PCR karışımı; 14 µl deiyonize su, 2.5 µl Taq tamponu, 3 µl MgCl₂, 1 µl dNTP, 0.5 µl *pvl*-1 (50 pmol/µl), 0.5 µl *pvl* -2 (50 pmol/µl), 0.5 µl *nuc*-1 (50pmol/µl), 0.5 µl *nuc*-2 (50 pmol/µl), 0.5 µl Taq DNA polimeraz ve 2 µl DNA eklenerek toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı⁸. Çalışmada kullanılan primerler Tablo I'de gösterildi.

Amplifikasyon 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye birleşme, 72°C'de 1 dakika uzama basamağı (30 döngü) ve 72°C'de 5 dakika son uzama basamağı (1 döngü) olacak şekilde gerçekleştirildi⁸. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforez ile incelendi. *S.aureus* LY 1999 0053, *pvl* genleri için pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 1).

İstatiksel Analiz: 2005 ve 2006 yıllarındaki *pvl* prevalansı arasındaki farkın önemi Fisher kesin testi ile araştırıldı⁹.

Tablo I. PCR Analizi İçin Kullanılan Primerler

Primer	Ürün Büyüklüğü (Baz Çifti)	Kaynak No.
<i>pvl</i> -1 ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A <i>pvl</i> -2 GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC	433	6
<i>nuc</i> -1 GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT <i>nuc</i> -2 AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	280	16

BULGULAR

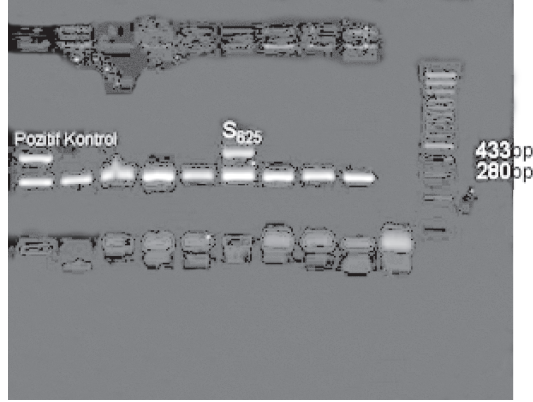
Multipleks PCR yöntemiyle 2005-2006 yılına ait MRSA izolatlarında PVL bulunmazken, 2005 yılına ait 40 MSSA suşunun 2'sinde (%5) ve 2006 yılına ait 39 MSSA suşunun 4'ünde (%10.3) *pvl* geni saptanmıştır (2005 ve 2006 yılları için $p < 0.05$), (Şekil 1 ve Tablo II).

Tablo II. MRSA ve MSSA İzolatlarında PCR İle Saptanan PVL Pozitifliği

Yıl	PVL Pozitifliği	
	MSSA	MRSA
2005 (Ocak-Aralık)	2/40*	0/31
2006 (Ocak-Mayıs)	4/39*	0/24

* $p < 0.05$.

Çalışılan örnekler arasında *pvl* pozitif izolatların varlığı açısından fark bulunmamıştır. Pozitif örneklerin Genel Cerrahi Poliklinik/Servis, Kardiyoloji Servis ve Koroner Yoğun Bakım ünitelerinden gönderildiği gözlenmiştir. PVL saptanan izolatların servislere ve klinik örneklerle göre dağılımı Tablo III ve IV'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Multipleks PCR ile *pvl* ve *nuc* genlerinin jel görüntüsü (Pozitif kontrol: *S.aureus* LY 1999 0053 suşu, S₆₂₅: 2005 yılında genel cerrahi polikliniğine başvuran bir hastanın yara örneğinden izole edilen MSSA suşu).

Tablo III. Ocak 2005- Mayıs 2006 Tarihleri Arasında İzole Edilen MSSA İzolatlarının ve PVL Pozitif Bulunan Suşların Poliklinik ve Servislere Göre Dağılımı

Poliklinik ve Servisler	PVL Pozitif Suş/Toplam Suş (%)
Genel Cerrahi Servis	1/4 (25)
Genel Cerrahi Poliklinik	3/4 (75)
Kardiyoloji Servis	1/5 (20)
Koroner Yoğun Bakım	1/4 (25)
Ortopedi Servis	0/3
Ortopedi Poliklinik	0/5
Dermatoloji Servis	0/3
Dermatoloji Poliklinik	0/2
Onkoloji	0/6
Enfeksiyon Hast. Servis	0/2
Enfeksiyon Hast. Poliklinik	0/1
Hemodializ	0/5
Acil Servis	0/3
Fizik Tedavi Servis	0/2
Çocuk Hast. Servis	0/4
Çocuk Hast. Poliklinik	0/1
Göğüs Hast. Servis	0/4
Kadın Hast. Servis	0/2
İç Hast. Servis	0/2
İç Hast. Poliklinik	0/1
Dahiliye Yoğun Bakım	0/3
Nefroloji Servis	0/2
Endokrinoloji Servis	0/2
Plastik Cer. Servis	0/1
Kalp-Damar Cer. Servis	0/1
Kemoterapi Servis	0/1
Nöroloji Servis	0/1
Anestezi Yoğun Bakım	0/1
Gastroenteroloji Servis	0/1
Prematüre Servis	0/1
Romatoloji Servis	0/1
Özel Hasta Katı	0/1

Tablo IV. PVL Pozitif Bulunan İzolatların Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

MSSA Suşlarının İzolasyon Yılı	PVL Pozitifliği		
	Yara-Aspirasyon Örnekleri	Kan Örnekleri	Balgam-Trakeal Sekresyon Örnekleri
2005	1/16	0/14	1/10
2006	2/19	2/13	0/7

TARTIŞMA

S.aureus suşları bir grup enzim ve sitotoksin oluşturarak birçok enfeksiyona yol açabilmektedir¹⁰. Panton-Valentin lökositidin (PVL), nekroz ya da apoptoz ile polimorfonükleer hücrelerin ölümüne neden olduğu için *S.aureus*'un virülansında önem taşımaktadır¹¹. Son yıllarda PVL, toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunması ile gündeme gelmiştir, ancak bu sitotoksinin hastane kökenli MRSA izolatlarında da yayıldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır¹².

Metisiline duyarlı ve dirençli *S.aureus* izolatlarındaki PVL pozitiflik oranı coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermektedir^{3,12,13}. Bazı çalışmalarda hastane kökenli MRSA suşlarındaki PVL oranı MSSA suşlarındaki PVL oranından daha yüksek iken, bazı çalışmalarda da tersi bir durum söz konusudur^{12,13}. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, toplum kökenli MRSA suşlarının %72'sinde, hastane kökenli MRSA izolatlarının %23'ünde, poliklinik hastalarından izole edilen MSSA izolatların %20'sinde ve yatan hastalardan izole edilen MSSA izolatların %5'inde PVL saptandığı bildirilmiştir¹². Cezayir'de ise 2003-2004 yılları arasında izole edilen 21 toplum kökenli MRSA suşunun %86'sında, 40 hastane kökenli MRSA suşunun %67.5'inde PVL saptanmıştır¹⁴. Diep ve arkadaşlarının⁵ 2000 ve 2002 izolatları ile San Francisco'da yaptıkları çalışmalarında, hastane poliklinik ve servislerinden izole edilen MRSA izolatların %35.4'ünde (2000) ve %37'sinde (2002), MSSA izolatların ise %6.7'sinde PVL saptanmıştır. Aynı çalışmada mahkumlardan izole edilen MRSA izolatlarında prevalansın %70.2'ye ulaştığı ve PVL pozitif izolatların esas olarak iki klonal gruba ait olduğu gösterilmiştir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada 2000 yılında toplanan MRSA izolatlarının %5'inde, 2002 yılında toplanan MRSA izolatlarının ise %15'inde PVL bulunmuştur¹⁵. Kanada'da yapılan bir çalışmada da klinik MRSA izolatlarının %50'sinde PVL saptanmıştır¹.

Bizim çalışmamızda, hastanemizdeki MRSA izolatlarında PVL varlığı saptanmamıştır. İlginç olarak nitelendirilebilecek bu sonucun, ülkemizde henüz bu konuda yapılmış geniş kapsamlı bir çalışma bulunmadığından tartışılması mümkün olmamıştır. Çalışmaya alınan 79 MSSA suşunun %7.6'sında *pvl* geni saptanmış ve çalışmamızın sonuçlarına göre bu sitotoksinin 2006 yılı MSSA izolatlarındaki prevalansının 2005 yılı izolatlarına oranla iki kat arttığı belirlenmiştir. *pvl* pozitif altı izolatın dördü genel cerrahi poliklinik ve servisinden izole edilmiştir. Bu durum hastane kökenli bir yayılım olabileceğini akla getirmektedir. Çalışmaya alınan izolat sayısının az olmasına ve hastalar hakkında klinik bilgi

bulunmamasına rağmen, 2006 yılında 2005 yılına kıyasla PVL pozitif izolat prevalansındaki artış, yakın gelecekte bu sitotoksini üreten MRSA suşlarının da görülebileceğini düşündürmektedir. Hastane kökenli enfeksiyonlarda, genel enfeksiyon önlemlerine uyulması ile bu artışın önüne geçilebilir. Bunun dışında, PVL üreten izolatların toplumdaki yayılım dinamiklerinin incelenebileceği daha geniş kapsamlı çalışmalar hedeflenmelidir.

KAYNAKLAR

1. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Pantone-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 6147-9.
2. Salliot C, Zeller V, Peuchal X, et al. Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: report of 4 French cases. J Infect Dis 2006; 38: 192-234.
3. McClure J, Conly J, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin susceptible from -resistant staphylococci. J Clin Microbiol 2006; 44: 1141-4.
4. Prevost G, Cribier B, Couppie P, et al. Pantone-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect Immun 1995; 63: 4121-9.
5. Diep B, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Pantone-Valentine leucocidin. J Clin Microbiol 2004; 42: 2080-4.
6. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32.
7. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. Epidemiol Infect 1994; 113: 259-66.
8. Girvan K. PCR for detection of PVL gene. Scottish MRSA Reference Laboratory Standard Operating Procedure, 2004.
9. Aksakoğlu G. Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri, s: 260-263. 2001, Dokuz Eylül Üniversitesi Yayını, İzmir.
10. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 16-34.
11. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, et al. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and includes bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest 2005; 115: 3117-27.
12. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratias S, Dimitracopoulos G, Sipiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 29-34.
13. Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhaes AC, et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages. J Clin Microbiol 2006; 44: 1686-91.
14. Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1083-5.
15. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, et al. Emergence of virulent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in the Netherlands. J Clin Microbiol 2005; 43: 3341-5.
16. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 2786-90.