

HASTANE KAYNAKLI METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARI ARASINDA KLONALİTENİN VE PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN TOKSİNİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF THE CLONALITY AND PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN TOXIN AMONG NOSOCOMIAL METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

Sevin KIRDAR¹, Uğur ARSLAN², İnci TUNCER³, Duygu FINDIK³, Bülent BOZDOĞAN⁴

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

³ Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.
(duygufin@yahoo.com)

⁴ Adnan Menderes Üniversitesi, BİLTEM Epidemiyoloji Birimi, Aydın.

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, hastanede yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen MRSA suşları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi ve bu suşlarda virülans faktörü olan Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksin geninin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2006-2007 yılları arasında hastanemizin çeşitli cerrahi, dahili ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan alınan 31'i cerrahi yara, ikisi abse ve dördü drenaj örneğinden izole edilen toplam 37 MRSA suşu dahil edilmiştir. İzolatlar arası klonalite PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) yöntemiyle, PVL gen varlığı ise luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Suşların %83.8'inin (31/37) A tipi pulstotip ve varyantlarına ait olduğu, diğer altı suştan üçünün B, üçünün ise C pulstotipi olduğu görülmüştür. Pulstotip A'nın, göğüs kalp damar cerrahisi başta olmak üzere diğer cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinde, pulstotip B'nin ortopedi ve pulstotip C'nin nöroloji ve beyin cerrahisi bölümlerinde yatan hastalara ait örneklerden izole edildiği belirlenmiştir. Çalışılan izolatların hiçbirisinde PVL toksin geni bulunamamıştır. Sonuç olarak; hastanemizde izole edilen MRSA suşları arasında yaygın bir klonun (pulstotip A) varlığı belirlenmiş, ancak bazı cerrahi kliniklerde farklı pulstotiplerin egemen olabildiği de gösterilmiştir. Sürekli yapılacak süveyans çalışmaları ile, hastanelerde yaygın olan klonların zaman içindeki de-

* Bu çalışma, S. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (24-28 Haziran 2008, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

ğışiminin izlenmesi ve nozokomiyal MRSA suşlarında PVL varlığının araştırılması değerli klinik ve epide-
miyolojik bilgiler sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, klonalite, Panton-Valentin lökositidin.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major causes of morbidity and mortality in hospitalized patients. This study was aimed to investigate the clonality of the MRSA strains isolated from patients with nosocomial infection and also to determine the presence of Pantone-Valentine leukocidin (PVL) toxin in these isolates. A total of 37 samples (31 isolated from surgical wound samples, 2 them from abscess and 4 from drainage samples) obtained from patients hospitalized at surgery, internal medicine and intensive care units, were included to the study. The clonality among MRSA strains was demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and the presence of PVL by polymerase chain reaction using luk-PV-1 and luk-PV-2 primers. PFGE revealed that 31 of 37 strains were A pulsotype and subtypes, 3 strains were B pulsotype and the last 3 were C pulsotype. Pulsotype A has been isolated especially from cardiovascular surgery and other surgery departments and intensive care units, pulsotype B from orthopedic and pulsotype C from neurology and neurosurgery wards. PVL gene was not identified in any of the isolates. These results indicated the presence of a dominant clone among MRSA strains in our hospital, however, different pulsotypes may also be present in different surgery units. Continuous molecular epidemiological surveillance of nosocomial MRSA strains and their PVL positivity supply valuable clinical and epidemiological data for infection control and patient follow-up.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, clonality, Pantone-Valentine leukocidin.

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları, hastanede yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir¹⁻³. MRSA ile enfekte/kolonize hastaların ve hastane personelinin bu suşların yayılımını kolaylaştırması, enfeksiyonların tedavi maliyetinin ve mortalite oranının yüksek olması gibi nedenlerden dolayı, hastane içinde MRSA yayılımının önlenmesi ve tedavide uygun antibiyotiğin seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en önemli adımlardan birisi bu suşların hızlı ve doğru olarak tanımlanmasıdır^{4,5}. Gerek hastane gerekse toplum kaynaklı MRSA suşlarıyla oluşan klonalitenin saptanması için birçok genotipik yöntem mevcut olup, bunlar arasında altın standart olarak kabul edilen PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır⁶⁻⁸.

Metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların patogeneğinde, bakteriye ait yüzeyel komponentlerin yanı sıra çok sayıdaki ekstraselüler proteinler, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Bunlar arasında yer alan Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksini, temel savunma hücreleri olan nötrofiller, monositler ve makrofajlarda por oluşumuna yol açarak bu hücrelerin parçalanmasına ve nekroza neden olmaktadır^{9,10}. PVL, hem normal hem de bütünlüğü bozulmuş deride nekrotik etkiye sahiptir^{11,12}. PVL üretiminin fronkül, abse, nekrotik deri enfeksiyonları ve ağır nekrotizan pnömonilerle ilişkili olduğu gösterilmiştir⁹.

Bu çalışmada, nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan MRSA suşlarında PVL varlığının belirlenmesi ve izolatlar arasındaki genetik ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmaya, 2006-2007 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi, Beyin Cerrahisi, Göğüs Kalp Damar Cerrahisi (GKDC), Ortopedi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, Göğüs Hastalıkları, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Nöroloji, Dahiliye ve Acil Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ)'nde yatan hastalardan alınan ve Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen cerrahi yara, abse ve drenaj örneklerinden izole edilen MRSA suşları alındı. Konvansiyonel yöntemlerle stafilokok olarak tanımlanan izolatlar, otomatize sistemle (Phoenix, Becton Dickinson ID, ABD) tür düzeyinde tanımlandı. *S.aureus* olduğu saptanan izolatlarda metisilin direnci, sefoksitin diski (30 µg, Oxoid) kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile tespit edildi ve inhibisyon zon çapı ≤ 21 mm olan suşlar metisiline dirençli olarak kabul edildi.

PFGE Yöntemi

Izolatların genotipik analizi PFGE yöntemi ile çalışıldı⁷. Kanlı agarda üreyen MRSA izolatlarından tek koloni alınarak "Brain Heart Infusion (BHI)" buyyonda 37°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra, bulanıklığı spektrofotometre ile 620 nm dalga boyunda 0.9-1.0 absorbans olacak şekilde ayarlanan bu süspansiyondan 300 µl, 1.5 ml'lik steril tüplere aktarıldı ve 10.000 x g'de hızda 5 dakika santrifüj edildi. Çökelti, 100 µl Tris-EDTA (TE) tamponu içinde tekrar süspanse edildi ve bu süspansiyondan düşük erime dereceli agar ile DNA kalıpları hazırlandı. Önce oda ısısında sonra buzdolabında bekletilerek katılaşmaları sağlanan DNA kalıpları, içerisinde 1 ml erime tamponu (6mM TrisHCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, %0.5 Brij-58, %0.5 sodyum lauroylsarkozin, %0.2 sodyum deoksikolat) ve lizostafin (100 µg/ml, Sigma Chemical Co, St. Louis) bulunan ependorf tüplerinde 8 saat 37°C'de bekletildi. Erime tamponunun ortamdan uzaklaştırılmasından sonra 1 ml ESP tamponu (1 mg/ml proteinaz K, sarkozin ve 0.5 M EDTA) içinde 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda DNA kalıpları 1 ml TE tamponu ile 3 kez yıkandı ve Smal enzimi ile 30°C'de bir gece boyunca inkübe edilerek kesilmesi sağlandı. Elde edilen kesim ürünlerine %1'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı. Bantlar CHEF DR III ile ayrıldı. Elektroforez, 200 V (6 V/cm), 14°C'de, "pulse" zamanı 5-25 saniye olacak şekilde 18 saat sürede gerçekleştirildi ve jel etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ile görüntülendi. Elde edilen sonuçlar Tenover kriterlerine göre değerlendirildi⁸. Oluşan bant paternleri birbirinin aynısı ise benzer, 1-3 bant farkı gösteriyor ise epidemiyolojik olarak ilişkili olarak yorumlandı.

PVL Gen Varlığı

Bu amaçla, luk-PV-1 (5'-ATCATTAGGTAAATGTCTGGACATGATCCA-3') ve luk-PV-2 (5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3') primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı⁹. DNA izolasyonu, QIAGEN DNeasy kiti (QIAGEN, Crawley, İngiltere) ile üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. DNA amplifikasyonu daha önce tanımlanan yöntemle gerçekleştirildi⁹. Klinik suşlar ve pozitif kontrol suşlarında (*S.aureus* ATCC 49775 ve standart suş LY19990053) PVL için 433 bazlık ürünün varlığı değerlendirildi⁹.

BULGULAR

Çalışmamızda, yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen ve sefoksitine dirençli bulunarak MRSA olarak kabul edilen 37 suş değerlendirilmiştir. Bunların 31'i cerrahi yara, 2'si abse ve 4'ü drenaj örneğinden izole edilen suşlardır. Suşların 12'si ortopedi, 11'i GKDC, 6'sı YBÜ ve 8'i de diğer kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilmişlerdir.

PFGE sonucunda, 37 suştan 31 (%83.8)'inin A tipi pulsotip ve varyantlarına (4 adet A1 ve 2 adet A2) ait olduğu belirlenmiştir. Geri kalan 6 suştan 3'ünün B pulsotipi (2 adet B ve 1 adet B1), diğer 3'ünün ise C pulsotipi olduğu görülmüştür. A tipi özellikle GKDC yoğun bakım ünitesi (11 adet) ile diğer cerrahi ve YBÜ'lerden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. Pulsotip B ortopedi, pulsotip C ise nöroloji ve beyin cerrahisi bölümlerinden gönderilen örnekler için tiplerdir. Çalışılan izolatların hiçbirisinde PVL toksin geni saptanmamıştır.

TARTIŞMA

S.aureus suşları klonal yayılım gösterme kapasitesine sahiptir. Bir klon, belirli bir serviste, hastanede, şehirde, ülkede ve hatta dünyada bulunduğu ortamda yaşayabilmek için gerekli virülans ve direnç faktörlerini elde etme başarısını gösterdiğinde yaygın hale gelebilmektedir. Bu nedenle özellikle çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatlar olmak üzere MRSA izolatlarının yayılımının epidemiyolojik yöntemlerle izlenmesi önemlidir. Teknolojinin gelişmesine paralel olarak son yıllarda birçok farklı epidemiyolojik tiplendirme yöntemi uygulamaya girmiştir. Bu yöntemler içerisinde sıklıkla tercih edilen PFGE, salgın araştırmalarında önemli bir yere sahiptir^{7,8}. Çalışmamızda da, hastane kökenli MRSA izolatları arasındaki genetik ilişki PFGE yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Hastane kökenli MRSA suşlarının yanı sıra, ağır nekrotik enfeksiyonlar yapan toplum kökenli MRSA'lar da son yıllarda insan sağlığı için tehdit oluşturmaya başlamıştır¹⁰. Nekrotizan enfeksiyonlara neden olan toplum kökenli MRSA'lar PVL toksinini, hastane kaynaklı MRSA suşlarına göre daha sık oranda taşımaktadır¹¹. Bizim çalışmamızda izolatların hiçbirisinde PVL toksin geni saptanmamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da, hastane kaynaklı MRSA'lar arasında PVL varlığı nadir olarak bildirilmiştir^{13,14}. Özkul ve arkadaşları¹³ kan, yara ve solunum örneklerinden izole edilen 79 metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatında PVL toksinini pozitif bulurken, 75 MRSA izolatının hiçbirisinde PVL genini saptamamışlardır¹³. Ellington ve arkadaşları¹⁴ da, bakteriyemili hastalardan izole edilen 244 *S.aureus* suşunda PVL toksin pozitifliğini %1.6 oranında bulurken, %36'sı MRSA olan bu izolatların hiçbirisinde PVL toksinini pozitif bulamamışlardır.

Bu çalışmada, hastanemizde yatan hastaların cerrahi yara, abse ve drenaj örneklerinden izole edilen MRSA suşları arasında yaygın bir klonun (pulsotip A) varlığı belirlenmiş, buna karşın bazı cerrahi kliniklerde farklı pulsotiplerin egemen olabildiği de gösterilmiştir. Ancak, yaygın olarak saptadığımız pulsotip A'nın, bölgedeki ve ülkemizdeki yaygın diğer suşlarla karşılaştırılması, henüz böyle bir veri tabanı olmadığı için yapılamamıştır. Sürekli yapılacak surveyans çalışmaları ile hastanelerde yaygın olan klonlardaki değişimin zaman içinde izlenmesi değerli epidemiyolojik bilgiler sağlayacaktır. MRSA'nın olgular

arasındaki geçişinde en önemli faktörün hastane personeli olduğu da göz önüne alınarak, hastane enfeksiyon kontrolü uygulamalarında gerekli önlemlerin alınmasıyla bu tür enfeksiyonların morbidite ve mortalite oranları azaltılabilir. Her ne kadar hastanemizde izole edilen suşlarda PVL toksini saptanmamış olsa da, bu toksini taşıyan suşların ek direnç ve virülans faktörlerini kazanmadan önce hastane ortamlarında yayılımını önlemek amacıyla hastane kaynaklı MRSA suşlarında bu toksinin varlığı sürekli gözlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 781-91.
2. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005; 40: 562-73.
3. Rajadurai K, Mani KR, Panneerselvam K, Mani M, Bhaskar M, Manikandan P. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 34-8.
4. Weller TM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? J Hosp Infect 2000; 44: 160-72.
5. Bartzavali-Louki C, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Polymerase chain reaction fingerprints of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece are related to certain antibiotype. J Microbiol Methods 2003; 53: 417-22.
6. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka GA. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz J Infect Dis 2003; 7: 32-43.
7. McDougal LK, Steward DC, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from United States: establishing a national database. J Clin Microbiol 2003; 41: 5113-20.
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
9. Gerard Lina, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29: 1128-32.
10. Voyich JM, Otto M, Mathema B, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J Infect Dis 2006; 194: 1761-70.
11. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest 2005; 115: 3117-27.
12. Gülay Z. Gram pozitif bakteri enfeksiyonları: direnç ve epidemiyoloji. 23. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, 28 Mayıs-01 Haziran 2008, Çeşme-İzmir. Konferans, Genel Oturum ve Panel Sunuları Kitabı, s: 275-86.
13. Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Investigation of the presence of Panton-Valentin leucocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul 2007; 41: 357-62.
14. Ellington MJ, Hope R, Ganner M, et al. Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? J Antimicrob Chemother 2007; 60: 402-5.