

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ ERİŞKİN HASTANESİNDE 2004-2005 YILLARINDA İZOLE EDİLEN HASTANE KAYNAKLI METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ EPİDEMİYOLOJİK VE MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF HOSPITAL-ACQUIRED METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED IN HACETTEPE UNIVERSITY ADULT HOSPITAL IN 2004-2005

Hadim AKOĞLU¹, Pınar ZARAKOLU¹, Belgin ALTUN¹, Serhat ÜNAL¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.
(drakomd@yahoo.com)

ÖZET

Bu çalışmada Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde yatan hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden izole edilen hastane kaynaklı (HK) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının (n= 110) epidemiyolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolatların elde edildiği klinik örnekler, servisler, antibiyotik duyarlılıkları, klonalite farklılıkları ile stafilkokal kromozomal kaset *mec* (SCC*mec*) ve Panton-Valentine Lökosidin (PVL) gen varlığı araştırılmıştır. İzolatların tanımlanması Sceptor otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile yapılmıştır. *MecA* geninin yanı sıra SCC*mec* tipleri ve PVL gen varlığının saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmıştır. Klonal farklılıkların değerlendirilmesi için "pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) uygulanmıştır. Çeşitli antibiyotiklere duyarlılık "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre disk difüzyon ve E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemleriyle saptanmıştır. İzolatların elde edildiği klinik örnekler (37 pü, 35 kan, 23 derin trakeal aspirasyon, 5 kateter, 10 diğer) ağırlıklı olarak (%71) yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerden elde edilmiştir. İzolatların tümünde *mecA* geni pozitif bulunmuş; 68 (%61.8)'inde SCC*mec* tip III, 38 (%34.5)'inde SCC*mec* varyant IIIB ve 3 (%2.7)'ünde SCC*mec* tip IV tespit edilmiştir. Bir suşta *mecA* geni pozitif olup, SCC*mec* tipleri arasında sınıflandırılmamıştır. PVL geni toplam 14 (%12.7) suşta pozitif bulunmuştur. İzolatların tümü tigesiklin, linezolid, vankomisin ve teikoplanine duyarlı iken; trimetoprim-sülfametoksazole %90, klindamisine %53, eritromisine %32'sinin duyarlı; gentamisin, siprofloksasin ve rifampine ise yüksek oranda (> %90) dirençli olduğu belirlenmiştir. Tüm MRSA suşları PFGE paternlerine göre değerlendirildiğinde 8 pulsotip (A, B, C, D, K, L, N, O) ayırt edilmiştir. İzolatların %92.7'sinin pulsotip A paterni gösterdiği saptanmıştır. Hastanemizde ağırlıklı olarak çeşitli yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerde yatan hastaların pü ve kan örneklerinden izole edilen HK-MRSA izolatlarının çoklu ilaç direncine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu izolatların bü-

yük çoğunluğunun SCCmec III veya varyant tip IIIB taşıdığı belirlenmiştir. Toplum kökenli MRSA'nın bilinen bir virulans faktörü olan PVL, HK-MRSA izolatlarında da önemli oranda saptanmıştır. Bu durum MRSA izolatlarının değişen epidemiyolojisinin takibinin önemini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine lökositidin, stafilokokal kromozomal kaset mec.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the epidemiological and molecular characteristics of hospital-acquired (HA)-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates by investigating the distribution of clinical samples according to the hospital wards, antibiotic susceptibility patterns, staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCCmec) types and the presence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes. A total of 110 MRSA isolates obtained from various clinical samples of inpatients at Hacettepe University Adult Hospital between January 2004 and December 2005 were included in the study. The identification of the isolates was done by BD Sceptor automated system (Becton Dickinson, USA). The *mecA* gene, SCCmec types and PVL genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed to examine the clonal relatedness. The susceptibility testing was performed for some antibiotics by E-test (AB Biodisk, Sweden) and for the others by disk diffusion methods according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations. The clinical samples (35 blood, 37 pus, 23 deep tracheal aspiration, 5 catheter, and 10 other samples) that yielded the MRSA strains were isolated from patients (71.5%) at intensive care units and surgical wards. All the isolates were positive for *mecA* gene. Of the isolates, 68 (61.8%) were harboring SCCmec type III, 38 (34.5%) SCCmec variant IIIB, and 3 (2.7%) SCCmec type IV. One isolate which was *mecA* gene positive could not be classified in any of the SCCmec types. PVL was positive in 14 (12.7%) of the isolates. All MRSA strains were susceptible to tigecycline, linezolid, vancomycin and teicoplanin; however, exhibited high rates (> 90%) of resistance to gentamicin, ciprofloxacin and rifampin. Susceptibility rates to trimethoprim/sulfamethoxazole was 90%, clindamycin 53% and erythromycin 32%. Eight pulsotypes were distinguished on the basis of PFGE (A, B, C, D, K, L, N, O). Of the total isolates, 92.7% belonged to pulsotype A. HA-MRSA strains predominantly isolated from pus and blood samples of inpatients at intensive care units and surgical wards in our hospital were multi-resistant. Majority of these isolates were SCCmec III, or variant IIIB type. Although PVL is known as a common virulence factor of community-acquired MRSA, HA-MRSA isolates in our center have a considerable rate of PVL positivity pointing out the importance of surveillance of the changing epidemiology of MRSA.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leukocidin, staphylococcal chromosome cassette mec.

GİRİŞ

Yarı-sentetik ve beta-laktamaza dayanıklı bir penisilin olan metisiline karşı dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları, 1960'lı yılların başından itibaren Avrupa'da tanımlanmaya başlanmıştır¹. Yakın geçmişe kadar özellikle hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri içinde yerini alan metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA), günümüzde toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında da giderek artan oranda görülmekte, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmakta, yüksek bir ekonomik yük oluşturmaktadır². Hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) ile toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) izolatların genellikle farklı epidemiyolojik ve moleküler özellik paterni göstermekte olduğu ifade edilmektedir³.

MecA geni aracılığıyla kazanılan metisilin direnci, MRSA suşlarının tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı çapraz direnç göstermesine yol açmakta, sıklıkla çoklu ilaç direnci (≥ 3 antibiyotik grubu) göstermektedir. Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesinde, genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamıştır⁴. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metisilin direncinin tespitinde, MRSA suşlarının genotiplendirilmesinde ve virulans faktörlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır^{4,5}. Metisilin direncini taşıyan *mecA* geninin DNA dizi analizi yapılarak alt tipleri belirlenmiştir⁵. Ayrıca *mecA* geninin de içinde bulunduğu genomik bir ada olan stafilokokal kaset kromozom *mec* (*SCCmec*) tümüyle dizilenerek genetik yapıdaki varyasyonlara göre sınıflandırılmıştır⁶. Bu sınıflandırma, MRSA'nın hastane veya toplum kaynaklı olarak ayırımında oldukça önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte lökositleri tahrip eden ve doku nekrozuna yol açan bir toksini kodlayan "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geninin, yapılan birçok çalışmada, toplum kaynaklı suşların hemen tümünde bulunduğu gösterilmiş ve günümüzde hastane kaynaklı suşlardan ayırimda önemli bir özellik olarak kullanılmaya başlanmıştır⁷.

Bu çalışmada 1 Ocak 2004-31 Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF) Erişkin Hastanesinde yatmış olan hastalardan izole edilen MRSA suşlarının epidemiyolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolatların elde edildiği klinik örnekler, servislere göre dağılımı, antibiyotik duyarlılıkları, klonalite farklılıkları ile *SCCmec* ve PVL gen varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

HÜTF Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilen çalışmaya, 1 Ocak 2004-31 Aralık 2005 tarihleri arasında HÜTF Erişkin Hastanesinde yatan, hastane kaynaklı enfeksiyonu olan hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden [37 pü, 35 kan, 23 derin trakeal aspirasyon (DTA), 5 kateter, 4 bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı, 2 beyin omurilik sıvısı (BOS), 2 balgam, bir idrar, bir sinovyal sıvı] izole edilen toplam 110 MRSA suşu, her hastadan yalnız 1 izolat olacak şekilde dahil edildi. Hastaneye yatıştan 72 saat sonra, enfeksiyon klinik belirti ve bulguları gösteren hastalardan alınan örneklerde üreme olması, hastane kaynaklı enfeksiyon olarak kabul edildi⁸. İzolatların tanımlanması Sceptor otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile yapıldı.

Tüm izolatlar metisilin direncini doğrulamak için *mecA* geni ve ayrıca PVL gen varlığı için PCR ile test edildi⁹. PCR yönteminde pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 49775 kullanıldı. *SCCmec* genleri daha önce tanımlandığı şekilde multipleks-PCR yöntemiyle saptandı¹⁰. *MecA* geni amplifikasyonu için *mecA1*: 5'-GTT GTA GTT GTC GGG TTT GG-3', *mecA2*: 5'-CCA CCC AAT TTG TCT GCC AGT TTC TCC-3'; PVL gen amplifikasyonu için *lukPV1*: 5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3', *lukPV2*: 5'-GCA TCA A(GC)T GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3'; *SCCmec* amplifikasyonu için C1F2 F2: 5'-TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G-3', C1F2 R2: 5'-ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C-3', KDP F1: 5'-AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C-3', KDP R1: 5'-CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G-3', MEC1P2: 5'-ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC-3', MEC1P3: 5'-GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC-3', DCS F2: 5'-CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC-3', DCS R1: 5' CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG-3', R1F4 F3: 5'-GTG ATT GTT CGA GAT ATG TGG-3', R1F4 R9:

5'-CGC TTT ATC TGT ATC TAT CGC-3', RIF5 F10: 5'-TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G-3', RIF5 R13: 5'-GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C-3', IS431 P4: 5'-CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG-3', pUB110 R1: 5'-GAG CCA TAA ACA CCA ATA GCC-3', pT181 R1: 5'-GAA GAA TGG GGA AAG CTT CAC-3', *mecA* P4: 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3', *mecA* P7: 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3' primer olarak kullanıldı.

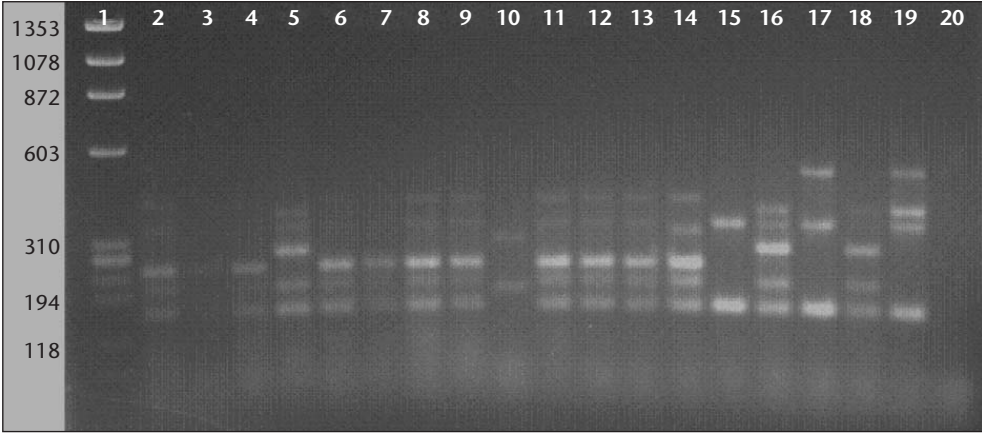
İzolatların klonalite farklılıklarının belirlenmesi amacıyla "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE) uygulandı. Agaroz bloklar içine yerleştirilmiş *S.aureus* DNA'ları daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı¹¹. Agaroz diskler içinde fikse edilen DNA, oda ısısında 100 µl restriksiyon tamponunda (6 mM TRIS, pH 8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 6 mM-2-Mercaptoethanol) 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra restriksiyona 45 µl restriksiyon tamponu ve Sma I (20 U) içinde 20 saat devam edildi. Reaksiyon 5 µl yükleme tamponu ile sonlandırıldı. %1.1 agarozlu (Genaxis Spech Bach, Almanya) jel 0.5 X TBE tampon (50 mM borik asit, 0.2 mM EDTA) içinde hazırlanıp, DNA makrorestriksiyon fragmentleri PFGE (General Navigator, Pharmacia, İsveç) ile ayrıştırıldı. Moleküler ağırlık belirteci olarak Λ -ladder (Sigma, Almanya) kullanıldı. PFGE için kullanılan elektroforez tankının (Gene Navigator, Pharmacia, İsveç) "pulse" parametreleri başlangıç zamanı 1 saniye, bitiş zamanı 30 saniye, çalışma süresi 22 saat ve voltaj 200 v= 6.0 olarak ayarlandı.

MRSA izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) besiyerinde standart disk difüzyon yöntemiyle uygulandı. Suşların, eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX, 1.25 µg/23.75 µg), rifampisin (5 µg), gentamisin (10 µg) ve siprofloksasine (5 µg) (Oxoid, İngiltere) karşı in vitro duyarlılıkları saptandı. Sonuçlar "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine uygun olarak yorumlandı¹². Linezolid, vankomisin, tigesiklin ve teikoplanin için duyarlılık, E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle araştırıldı. Standart suş olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 110 izolatın 63 (%57)'ü 1 Ocak 2004-31 Aralık 2004, 47 (%43)'si ise 1 Ocak 2005-31 Aralık 2005 tarihleri arasında izole edilmiştir. MRSA suşlarının 37 (%33.6)'si püye, 35 (%31.8)'i kan, 23 (%20.9)'ü DTA, 5 (%4.6)'i kateter, 10 (%9.1)'u ise diğer klinik örneklerden (BOS, idrar, BAL, balgam, eklem sıvısı) izole edilen suşlardır. İzolatların 39 (%35.5)'ünün yoğun bakım üniteleri (beyin cerrahi, genel cerrahi, iç hastalıkları), 39 (%35.5)'ünün cerrahi servisler (genel cerrahi, beyin cerrahisi, plastik cerrahi, üroloji, ortopedi, kulak burun boğaz, kalp-damar cerrahisi), 12 (%10.9)'ünün iç hastalıkları servisleri, 11 (%10)'ünün acil servis gözlem ünitesi (yatış süresi > 72 saat olan hastalar), 4 (%3.6)'ünün yanık ünitesi ve 5 (%4.5)'inin de diğer servislerden (dermatoloji, nöroloji, psikiyatri) gönderilen klinik örneklerden izole edildiği gözlenmektedir.

Tüm suşlarda *mecA* gen varlığı saptanarak metisilin direnci doğrulanmıştır. İzolatların 68 (%61.8)'inde SCC*mec* tip III, 38 (%34.5)'inde SCC*mec* varyant IIIB ve 3 (%2.7)'ünde SCC*mec* tip IV saptanmıştır (Şekil 1). Bir suşta *mecA* geni pozitif olup, SCC*mec* geni iki kez analiz edilmesine rağmen mevcut SCC*mec* tipleri arasında sınıflandırılamamıştır.



Şekil 1. Multipleks PCR yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirmesi. 1: Moleküler ağırlık belirteci (ϕ X174); 2-13: Hasta suşları; 14-19: Pozitif kontrol olarak kullanılan standart suşlar [SCCmec III için 162, 209, 243, 303, 414 bp (14), SCCmec IV için 162, 342 bp (15), SCCmec IIIA için 162, 209, 243, 414 bp (16), SCCmec I için 162, 342, 495 bp (17), SCCmec II için 162, 209, 284, 342, 381 bp (18), SCCmec IA için 162, 342, 381, 495 bp (19) büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi]; 20: Negatif kontrol. Pozitif kontrol olarak SCCmec I için *S.aureus* COL, SCCmec IA için *S.aureus* PER34, SCCmec II için *S.aureus* BK2464, SCCmec III için *S.aureus* ANS46, SCCmec IIIA için *S.aureus* HU25, SCCmec IV için *S.aureus* HDE288 kullanıldı.

Tüm izolatların 14 (%12.7)'ünde PVL pozitifliği saptanmıştır. 2004 yılında izole edilen HK-MRSA suşları arasında PVL pozitif suş sayısı 9 (%14), 2005 yılında PVL pozitif suş sayısı 5 (%11) olarak bulunmuştur. PVL pozitif suşların 8'i kan, 5'i DTA, 1'i püvy kültüründe üremiştir. PVL pozitif izolatların 10'unda SCCmec tip III, 4'ünde SCCmec varyant tip IIIB saptanmıştır. SCCmec IV taşıyan suşların hiçbirinde PVL pozitifliği saptanmamıştır. HK-MRSA suşlarının SCCmec tiplendirmesi ve PVL varlığına göre dağılımı Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I. HK-MRSA Suşlarının SCCmec Tiplendirmesi ve PVL Varlığına Göre Dağılımı

SCCmec tipi	PVL pozitif	PVL negatif	Toplam
SCCmec I	0	0	0
SCCmec IA	0	0	0
SCCmec II	0	0	0
SCCmec III	10	58	68
SCCmec IIIA	0	0	0
SCCmec IIIB	4	34	38
SCCmec IV	0	3	3
Sınıflandırılmayan	0	1	1
Toplam	14	96	110

HK-MRSA: Hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, PVL: Panton-Valentine Lökosidin.

Tablo II. MRSA Suşlarının SCCmec Tipi, PVL Gen Varlığı, PFGE Paterni ve Antimikrobiyal Direnç Profiline Göre Dağılımı													
SCCmec tipi	PFGE tipi	PVL	İzolat sayısı	Antimikrobiyal duyarlılık paterni									
				E	CL	TMP-SMX	R	GEN	CIP	L	VAN	TE	TG
III	A	-	17	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	-	14	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	-	11	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	-	6	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
III	A	-	3	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
III	A	-	2	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
III	A	-	1	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	+	2	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	+	1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
III	A	+	1	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	+	1	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
III	A	+	2	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	A	+	1	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
III	K	-	1	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
III	O	-	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
III	O	-	1	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
III	L	-	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
III	D	+	1	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
III	N	+	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	12	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	9	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S

Tablo II. MRSA Suşlarının SCCmec Tipi, PVL Gen Varlığı, PFGE Paterni ve Antimikrobiyal Direnç Profiline Göre Dağılımı (Devamı)

SCCmec tipi	PFGE tipi	PVL	İzolat sayısı	Antimikrobiyal duyarlılık paterni									
				E	CL	TMP-SMX	R	GEN	CIP	L	VAN	TE	TG
IIIB	A	-	6	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	2	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	1	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	1	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
IIIB	A	-	1	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
IIIB	A	+	1	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	+	1	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	A	+	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	B	-	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
IIIB	C	+	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
IV	A	-	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IV	A	-	1	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
IV	A	-	1	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
Sınıflandırı- lamayan	A	-	1	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S

E: Eritromisin, CL: Klindamisin, TMP-SMX: Trimetoprim-sülfametoksazol, R: Rifampin, GEN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, L: Linezolid, VAN: Vankomisin, TE: Teikoplanin, TG: Tigesiklin, R: Dirençli, S: Duyarlı.

Tüm MRSA suşları PFGE paternlerine göre değerlendirildiğinde 8 pulsotip ayırt edilmiştir (A, B, C, D, K, L, N, O). MRSA suşlarının %92.7 (n= 102)'sinin pulsotip A paterni gösterdiği saptanmıştır. Pulsotip O iki izolatta, diğer pulsotipler birer izolatta tespit edilmiştir. Pulsotip A dışında PFGE paterni gösteren izolatların servislere göre dağılımı incelendiğinde; pulsotip B ve K'nın yanık ünitesinden, pulsotip C'nin iç hastalıkları yoğun bakım ünitesinden, pulsotip D'nin acil servis gözlem ünitesinden, pulsotip L'nin iç hastalıkları servisinde, pulsotip N'nin beyin cerrahi yoğun bakım ünitesinden, pulsotip O'nun iç hastalıkları servisi ve beyin cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen suşlarda saptandığı belirlenmiştir. PVL pozitif izolatlar (n= 14) arasında 4 pulsotip (A, C, D, N) ayırt edilmiştir. Pulsotip A 11 izolatta, pulsotip C, D ve N birer izolatta tespit edilmiştir. SCCmec IV taşıyan üç suşun tamamının, SCCmec III taşıyan suşların %91 ve SCCmec IIIB taşıyan suşların %94.7'sinin majör klona dahil olduğu saptanmıştır.

Tüm suşlar tigesiklin, vankomisin, teikoplanin ve linezolidde duyarlı olup MIC_{90} değerleri sırasıyla 0.25 µg/ml, 2 µg/ml, 2 µg/ml ve 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışılan suşlar gentamisin, siprofloksasin ve rifampisine yüksek oranda (> %90) dirençli iken, TMP-SMX'e duyarlılık %90, klindamisine duyarlılık %53, eritromisine duyarlılık %32 olarak saptanmıştır.

MRSA suşlarının SCCmec tipi, PVL gen varlığı, PFGE paterni ve antimikrobiyal direnç profiline göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

MRSA tüm dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olmayı sürdürmektedir. Çok merkezli bir çalışmada güney ve batı Avrupa'daki hastanelerde MRSA enfeksiyonu prevalansı %40'ın üzerinde bildirilmiştir¹³. Hastanemizde, 2000-2004 yılları arasında izole edilen HK-*S.aureus* izolatlarının metisilin direnci %70'tir (Yayınlanmamış veri; Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Hastane Enfeksiyonları Sürveys Raporu, 2000-2004).

HK-MRSA enfeksiyonu vücutta en sık cerrahi yara yeri, cilt ve dolaşım sistemini tutmakta, ardından sıklık sırasına göre alt solunum yolu ve üriner sistem gelmektedir³. Bizim çalışmamızda MRSA suşlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde; sırasıyla püy (%33.6), kan (%31.8) ve DTA (%20.9) örnekleri tüm üremelerin %86'sını oluşturmaktadır. Çalışmamızda dikkati çeken önemli bir bulgu MRSA suşlarının %32'sinin kan kültüründe üremiş olmasıdır. MRSA'nın etken olduğu bakteriyemi invazif bir enfeksiyon olup prognozu olumsuz yönde etkilemektedir¹⁴. MRSA bakteriyemisi erişkin yaş grubunda -özellikle yaşlılarda- sık görülmekle birlikte çocuklarda da görülme sıklığı giderek artmaktadır¹⁵. Ayrıca, yatan hastalarda MRSA'ya bağlı bakteriyemi riskinin servislere göre farklılık gösterdiği ve en yüksek riskin genel cerrahi ve yoğun bakım ünitelerinde olduğu belirtilmektedir¹⁵. Bizim çalışmamızda, MRSA izole edilen kan kültürlerinin %63'ünün cerrahi servislere ve yoğun bakım ünitelerinden alındığı saptanmıştır. Suşların servislere göre dağılımlarına bakıldığında ise; yaklaşık %75'inin yoğun bakım, cerrahi servislere ve yanık ünitesinden izole edildiği görülmektedir. Bu bölümlerde yatmakta olan hastaların daha çok invazif işleme maruz kalması, altta yatan hastalığın diğer hasta-

lara göre daha ağır seyretmesi ve immün süpresyon sıklığının ve derecesinin daha fazla olması, bu durumu açıklayan özelliklerdir.

SCCmec; TK-MRSA suşlarından farklı olarak, HK-MRSA suşlarında kromozomal kaset bölgelerine entegre olmuş transpozon ve plazmidlerde yerleşmiş diğer direnç genlerini ihtiva etmektedir¹⁶. Bu genleri barındıran MRSA suşları, tedavi seçeneği olabilecek betalaktam olmayan antibiyotiklerin eliminasyonuna yol açacak şekilde çoklu ilaç direnci göstermektedir. Çalışmamızda, tüm izolatların %95.4'ünde çoklu ilaç direnci saptanmıştır. Bu bulgu, Güney ve Doğu Akdeniz ülkelerindeki MRSA suşlarında antibiyotik direnci prevalansını inceleyen ARMed (Antibiotic Resistance Surveillance and Control in the Mediterranean Region) Projesi raporu ile uyumlu bulunmuştur. Bu rapora göre, MRSA izolatlarında en yüksek çoklu direnç oranı %73 ile Türkiye'de saptanmıştır¹⁷. Çalışmamızda, HK-MRSA suşlarının siprofloksasin, rifampin, gentamisin, eritromisin ve klindamisine yüksek oranlarda direnç gösterdiği saptanmıştır. Benzer sonuçlar yakın zamanda, Türkiye'deki farklı bir merkez tarafından da rapor edilmiştir¹⁸. Bu çalışmada MRSA suşlarının TMP-SMX'e duyarlılık oranı %89 olarak bulunmuştur. Samra ve arkadaşları¹⁹ tarafından da HK-MRSA suşlarının TMP-SMX'e duyarlılık oranı %86 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, tüm MRSA suşlarının günümüzde geçerli tedavi seçenekleri olan glikopeptidler, linezolid ve tigesikline duyarlı olduğu gösterilmiştir.

SCCmec IV taşıyan üç MRSA suşunun direnç paternleri incelendiğinde, bir suşun tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Üroloji servisinde yatan bir hastanın kan kültüründen izole edilen bu suş, diğer SCCmec IV taşıyan suşlar gibi PVL negatif olup, PFGE paternine göre pulstip A olarak tanımlanmıştır. Bu suşun neden olduğu enfeksiyon, HK-MRSA enfeksiyonu kriterlerine uymakla birlikte, izolata diğerlerinden farklı olarak tüm antibiyotiklere duyarlı olması toplum kökenli bir MRSA suşu olma olasılığını akla getirmektedir.

Farklı epidemiyolojik paternlerin daha iyi anlaşılması için MRSA izolatlarının moleküler özellikleri büyük ölçüde tanımlanmıştır. SCCmec, TK- ve HK-MRSA suşlarının ayırımında oldukça önemli bir özelliktir. SCCmec tip IV taşıyan suşlar klasik olarak TK-MRSA olarak sınıflandırılmaktadır. Birçok çalışmada, TK-MRSA'ların istisnasız olarak SCCmec tip IV taşıdığı gösterilmiştir²⁰⁻²². PVL pozitifliği de MRSA suşunun toplum kökenli olduğunun önemli bir kanıtı olarak kabul edilmektedir. Dufour ve arkadaşları²³ HK-MRSA suşlarında PVL gen varlığının hiçbir zaman saptanmadığını belirtmişlerdir. Ancak Wannet ve arkadaşları²⁴ 2004 yılında Hollanda'da yaptıkları bir çalışmada, 2003 yılına ait MRSA suşlarını SCCmec tipi ve PVL varlığı açısından incelemişler, PVL pozitif suşların %80'inin SCCmec tip IV, %10'unun SCCmec tip III ve %10'unun SCCmec tip I taşıdığını saptamışlardır. Bu araştırmacılar, SCCmec tip III ve SCCmec tip I'in hastane kaynaklı suşları temsil etmeleri nedeniyle HK-MRSA suşlarının da PVL geni bulundurabileceğini savunmuşlar; ayrıca PVL pozitif suşların sadece toplumda değil hastane ortamında da bulunabileceğini öne sürmüşlerdir²⁴. Bu bulgu oldukça şaşırtıcı olup literatürde farklı yorumlara yol açmıştır. Bazı yazarlar bu durumu, SCCmec tip IV'ün bundan böyle TK-MRSA için evrensel bir özellik olmayacağı şeklinde yorumlamışlardır²⁵. Tunus'ta bir üniversite hastanesinde 2003-2004 yılları arasında 72 TK-MRSA suşu ile yapılan çalışmada, 64 suşta SCCmec IV

ve 2 suşta SCCmec varyant IVA, 4 suşta SCCmec tip III, 1 suşta SCCmec varyant IIIB ve 1 suşta SCCmec tip I saptanmıştır. İlginç olarak, SCCmec tip III taşıyan tüm MRSA suşlarında PVL pozitifliği saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu, PVL geni taşıyan fajların farklı suşlar arasında kolay yayılımına bağlamışlardır²⁶. Kılıç ve arkadaşları²⁷ 385 MRSA izolatını SCCmec tipi ve PVL gen varlığı açısından analiz etmişler, 330 izolatın SCCmec tip I, II veya III taşıdığını saptamışlar ve bu izolatların %0.3'ünde PVL geni tespit etmişlerdir. Türkiye'deki bir üniversite hastanesinde yapılan benzer bir çalışmada, 230 HK-MRSA izolatından birinde, 74 TK-MRSA izolatından 11'inde PVL gen varlığı gösterilmiş; ancak, PVL pozitif izolatların hiçbirinin SCCmec tip IV veya V taşımadığı görülmüştür²⁸. İsveç'te yapılan bir çalışmada ise PVL pozitif olup herhangi bir SCCmec tipine uymayan MRSA suşları tespit edilmiştir²⁹. Bu bulgu, yeni SCCmec tipleri taşıyan PVL pozitif MRSA klonlarının ortaya çıktığı ve toplum içinde yayılmaya başladığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışmalar, TK- ve HK-MRSA suşlarının, klasik genotipik tanımın dışında yeni moleküler özellikler kazanmaya başladığını göstermektedir. Bunlardan en önemlisi, HK-MRSA suşlarının PVL genlerini bulundurabilmesi ve enfeksiyonlara yol açabilmesidir.

Çalışmamızda, HK-MRSA suşlarının %12.7'sinde PVL pozitifliği saptanmış; PVL pozitif izolatların 10'unun SCCmec III, 4'ünün SCCmec varyant IIIB taşıdığı görülmüştür. Bu bulgu, HK-MRSA suşlarının yeni genotipik özellikler kazanması açısından literatürle uyumlu görülmektedir. HK-MRSA özellikle yaşlı, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir enfeksiyon nedenidir. TK-MRSA'ya göre daha invazif bir enfeksiyona neden olmaktadır. PVL ise toplum kökenli suşlarda en önemli virulans faktörü olup, PVL üreten TK-MRSA suşları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları yanında, genç ve daha önce sağlıklı olan bireylerde yüksek mortalite ile seyreden ciddi nekrotizan pnömoni ve sepsise yol açmaktadır^{24,30}. Çalışmamızda, HK-MRSA suşları arasında, Türkiye'den yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında daha yüksek oranda PVL pozitifliği (%12.7) bulunmuştur. Ayrıca, PVL pozitif MRSA suşlarının %36 (5/14)'sının yoğun bakım ünitelerinden izole edildiği saptanmıştır. Bu nedenle, özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen HK-MRSA suşlarının yeni moleküler özellikler kazanmış olması durumunda, daha invazif ve mortal seyreden enfeksiyonlara neden olabileceği akılda tutulmalıdır.

PVL pozitif MRSA ile ilişkili diğer önemli bir epidemiyolojik veri, bu suşların ciddi hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilmesidir. Cezayir'de yapılan bir araştırmada, 20 TK-MRSA suşunun %86'sında ve 41 HK-MRSA suşunun %67.5'inde PVL pozitifliği saptanmış; PVL pozitif suşların hepsinin SCCmec tip IV veya IVA taşıdığı tespit edilmiştir³¹. Bu durum, toplum kökenli bir klonu hastane salgını olabileceğini ya da hastane personelinin bu klonu hastane içine bulaştırmış olabileceğini düşündürmektedir. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada da, PVL pozitif-SCCmec IV taşıyan HK-MRSA'ların tüm HK-MRSA suşlarına oranının 2001 yılında %24 iken 2003 yılında %64'e yükseldiği tespit edilmiştir³². Bizim çalışmamızda, 2004 yılında izole edilen HK-MRSA suşlarının tüm HK-MRSA suşlarına oranı %14, 2005 yılında ise %11 olarak bulunmuştur. Bu veri, hastanemizde PVL pozitif HK-MRSA enfeksiyon insidansında bir artış olmadığını göstermekle birlikte, kesin bir yargıya varabilmek için ardışık yılların verilerine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, 110 HK-MRSA suşu taşıdıkları SCCmec genine göre tiplendirildiğinde 68 suшта SCCmec III, 38 suшта SCCmec varyant IIIB, 3 suшта SCCmec IV saptanmıştır. Bir suшта *mecA* geni pozitif olup, SCCmec geni mevcut SCCmec tipleri arasında sınıflandırılmamıştır. PVL pozitifliği 14 suшта saptanmış olup, bu suşların hiçbirinin SCCmec IV taşımadığı görülmüştür. Bu nedenle toplum kökenli bir klonun sebep olduğu bir hastane salgınından, toplumdan taşıyıcılık yoluyla hastane ortamına PVL pozitif suşların taşındığından ya da sağlık personeli tarafından PVL pozitif suşların hastane ortamına bulaştırıldığından bahsedilemez. Burada en uygun olabilecek açıklama, Jarraud ve arkadaşlarının³³ belirttiği gibi, PVL geninin fajlar aracılığıyla hastanemizdeki HK-MRSA suşlarına taşınmış olma olasılığıdır.

Hastanemizde izole edilen MRSA suşlarının büyük çoğunluğu pulsotip A olarak tanımlanmıştır. Pulsotip A, PVL pozitif MRSA suşları arasında da majör pulsotip olarak saptanmıştır. Bu bulguya dayanarak, hastanemizdeki MRSA'ya bağlı enfeksiyonların tek bir MRSA klonunun hastane içinde yayılımından kaynaklandığı düşünülebilir.

Bu çalışmada, iki yıllık bir süre içinde izole edilen HK-MRSA suşlarının moleküler özellikleri, klonalitesi ve antibiyotik duyarlılık paternleri incelenmiştir. Hastanemizde bir dominant, birkaç sporadik MRSA klonu tespit edilmiştir. Suşların büyük çoğunluğunun SCCmec tip III veya IIIB taşıdığı, yüksek oranda çoklu ilaç direnci gösterdiği görülmüştür. PVL pozitif HK-MRSA oranının oldukça yüksek olduğu ve çoğunluğunun PVL negatif suşlarla benzer PFGE paterni gösterdiği saptanmıştır. PVL pozitif ve negatif suşların aynı klona ait bulunması, HK-MRSA suşlarına PVL geninin belirli bir "donör" klondan taşındığı hipotezini desteklemektedir. Bu durumda PVL pozitif MRSA suşlarının hastane içindeki tüm MRSA suşlarına oranının sonraki yıllarda artış göstermesi beklenmelidir. PVL pozitif suşların çoğunda çoklu ilaç direnci saptadığımızdan, bu suşların etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, özellikle de yoğun bakım ünitelerinde, tanı ve tedavi yaklaşımı dikkatle yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

HK-MRSA klinik izolatlarının teminini sağlayan HÜTF Erişkin Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları Başkanı Prof. Dr. Gülşen Haşcelik'e, *S.aureus* standart suşlarını (*S.aureus* COL, PER34, BK2464, ANS46, HU25, HDE288) temin eden Prof. Dr. Zeynep Gülay'a ve çalışmanın yürütülmesinde verdiği teknik destekten dolayı Tekn. Gülden Ka'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 1968; 2: 741-4.
2. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. Emerg Infect Dis 1999; 5: 9-17.
3. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 2003; 290: 2976-84.
4. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 2240-4.

5. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1955-63.
6. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 349-61.
7. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 103-24.
8. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-40.
9. Unal S, Hoskins J, Flokowsch JE, Wu CY, Preston DA, Skatrud PL. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1685-91.
10. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2155-61.
11. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2059-63.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement M100-S15, 2005. CLSI, Wayne, Pa.
13. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, et al. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1627-34.
14. Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:455-62.
15. Khairulddin N, Bishop L, Lamagni TL, Sharland M, Duckworth G. Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia among children in England and Wales, 1990-2001. *Arch Dis Child* 2004; 89: 378-9.
16. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003; 6:41-52.
17. Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, et al. ARMed Project Members and Collaborators. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1310-5.
18. Tosun I, Udo EE, Noronha B, et al. Emergence of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated at a Turkish university hospital. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 48-52.
19. Samra Z, Ofer O, Shmueli H. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin, teicoplanin, linezolid, pristinaamycin and other antibiotics. *Isr Med Assoc J* 2005; 7: 148-50.
20. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2637-51.
21. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 349-61.
22. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* 2002; 186: 1344-7.
23. Dufour P, Gillet Y, Bes M, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 819-24.

24. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, et al. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes in The Netherlands. J Clin Microbiol 2005; 43: 3341-5.
25. Vandenesch F, Etienne J. How to prevent transmission of MRSA in the open community? Euro Surveill 2004; 9: 5.
26. Ben Nejma M, Mastouri M, Frih S, Sakly N, Ben Salem Y, Nour M. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Tunisia. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55: 21-6.
27. Kilic A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 94: 607-14.
28. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCC*mec* types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. Microb Drug Resist 2008; 14: 203-10.
29. Berglund C, Mölling P, Sjöberg L, Söderquist B. Predominance of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCC*mec* types with Panton-Valentine leukocidin genes. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 447-56.
30. Boussaud V, Parrot A, Mayaud C, et al. Life-threatening hemoptysis in adults with community-acquired pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-secreting *Staphylococcus aureus*. Intensive Care Med 2003; 29: 1840-3.
31. Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1083-5.
32. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 29-34.
33. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70: 631-41.