

Staphylococcus aureus izolatlarının tiplendirilmesinde çoklu lokus değişken sayı tekrar analizi (MLVA) ve darbeli alan jel elektroforez (PFGE) yöntemlerinin karşılaştırılması

Sümevra SAVAŞ^{1,*}

¹Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK, Bilgi ve Bilişim Güvenliği, İleri Teknolojiler Araştırma Merkezi, Kocaeli, Türkiye

Geliş Tarihi (Received Date): 28.04.2020
Kabul Tarihi (Accepted Date): 09.06.2020

Öz

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bakterisi için, çoklu lokus değişken sayı tekrar analizi (MLVA) yönteminin, altın standart olarak bilinen moleküler tiplendirme yöntemi darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) ile ayırt edebilme performansı araştırıldı. *S. aureus* için PFGE yönteminden elde edilen sonuçların MLVA yöntemi ile ne oranda sağlanabileceği belirlenmeye çalışıldı. Bu sayede rutin kullanımlarda zorlu bir yöntem olan PFGE yönteminin, daha kolay ve düşük maliyetli bir yöntem olan MLVA ile rutin de yer değiştirmesinin olanağı araştırıldı.

MLVA yöntemi hızlı bir DNA izolasyon yöntemi sonrası, *sdrCDE*, *clfA*, *clfB*, *sspA* ve *spa* lokusları için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. PFGE yöntemi ise *SmaI* enzimi kullanılarak elde edilen genomik DNA fragmanları ile gerçekleştirildi. Bantlama modeli, hem görsel olarak hem de Bionumerics yazılımı ile analiz edildi. PFGE ile izolatlar 2 küme ve 16 alt tipe ayrılırken, MLVA ile aynı izolatlar, küme oluşturmaksızın 31 alt tipe ayrıldı. PCR temelli bu yöntem ile, PFGE yöntemi ile ayırt edilemeyen alt tiplerin ayırt edilebildiği görüldü. Bu sebep ile MLVA yönteminin aynı PFGE paternleri ile ilgisiz suşları daha iyi tanımlamak veya ilişkili izolatların yakın genetik kompozisyonunu doğrulamak için yüksek epidemiyolojik çözünürlüğe sahip, alternatif, verimli moleküler tiplendirme yöntemi olarak kullanılabilmesi sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Çoklu lokus değişken sayı tekrar analizi (MLVA), darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), ayırım gücü, moleküler tiplendirme, *Staphylococcus aureus*.

* Sümevra SAVAŞ, sumeyra.savas@tubitak.gov.tr, <https://orcid.org/0000-0001-5057-9178>

Comparison of multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) and pulsed-field gel electrophoresis methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates

Abstract

In this study, the performance of multi locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) method to distinguish pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) types, known as the gold standard, for Staphylococcus aureus (S. aureus). It was tried to determine to what extent the results obtained from PFGE method for S. aureus can be obtained with MLVA method. In this way, the possibility of displacement of PFGE method, which is a challenging method in routine use, with MLVA, which is an easier and low cost method has been investigated.

MLVA method was performed using a polymerase chain reaction (PCR) method for sdrCDE, clfA, clfB, sspA and spa after a rapid DNA isolation method. The PFGE method was performed with genomic DNA fragments obtained using the SmaI enzyme. The banding model was analyzed both visually and with the Bionumerics software. While isolates were divided into 2 clusters and 16 subtypes with PFGE, the same isolates were divided into 31 subtypes without forming a cluster with MLVA method. With this PCR- based method, it was seen that the strains indistinguishable by PFGE method could be distinguished. Therefore, it was concluded that MLVA can be used as an alternative, efficient molecular typing method with high epidemiological resolution to better identify strains unrelated to the same PFGE patterns or to verify the close genetic composition of related isolates.

Keywords: *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), discrimination power, molecular typing, Staphylococcus aureus.*

1. Giriş

Staphylococcus aureus (S.aureus), sürülerde görülen en yıkıcı hastalıklardan birisi olan sığır mastitis hastalığına sebep olan birkaç farklı bakteriden biri olup [1], metisilin dirençli S. aureus (MRSA) başta olmak üzere, bu bakteri türü, insanlarda artış gösteren toplum kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu, önemli bir bakteriyel patojendir [2]. Bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve derin apse oluşumu gibi çeşitli klinik belirtileri vardır. Metisilin dirençli S. aureus özellikle hastanelerde önemli bir klinik sorun oluşturmaktadır. Dünya çapında MRSA enfeksiyon sayısı giderek artmakta olup, bu endişe verici bir durum almıştır [3-5]. Bu sebep ile S. aureus enfeksiyonlarını kontrol etmek, popülasyonun durumunu anlamak, alınan kontrol önlemlerine ilişkin kararları belirlemek ve toplum içerisinde yayılımı azaltarak, halk sağlığına faydalı olabilmek için S. aureus izolatlarının karakterizasyonu ve birbirileri arasındaki ayırımın hızlı yapılabilmesi oldukça önemlidir [3, 6, 7].

Patojenin dünya çapında yayılımı göz önüne alındığında, çiftliklerden topluma bulaşma süreci hakkında ve yine hastaneler içinde hızlı dağılıma geniş çaplı bir epidemiyolojik

çalışma ile cevap bulabilmek için, iyi ayırım gücüne sahip, hızlı ve kolay uygulanabilir moleküler tiplendirme yöntemlerinin bu patojen için belirlenmesi oldukça önemlidir [8].

Bir tiplendirme yöntemi hakkında karar verilirken, yöntemin değerlendirme aşamasında kullanılan kriterler, tekrarlanabilirlik, ayırım gücü, uygulama ve yorumlama kolaylığı oldukça önemlidir [9,10]. Moleküler tekniklerin kullanılmaya başlamasına kadar, *S. aureus* için bilinen en iyi tiplendirme metodu faj tiplendirme metoduuydu [11]. Moleküler tiplendirme yöntemleri ile birlikte, *S. aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılan yöntemlerden ribotiplendirme, amplifiye edilmiş fragman uzunluğu polimorfizmi, ssCmec tiplendirme yöntemleri bunlardan birkaçı olup [12, 13, 14] *S. aureus* izolatlarının ayırımında en yaygın olarak kullanılan yöntemler altın standart olarak bilinen darbeli alan jel elektroforez yöntemi (PFGE), çok bölgeli dizileme (MLST) ve *spa* dizileme yöntemleridir. PFGE yöntemi, *Sma*I restriksiyon enzimi ile tüm genomik DNA'nın fragmanlara ayrıldıktan sonra, özel bir agaroz jelde ayrılması esasına dayanır. MLST yöntemi ise, 7 "housekeeping" genin DNA dizi analizine dayanan laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için uygun bir tiplendirme yöntemidir. Buna rağmen, PFGE yöntemi bant boyutlarında belirsizlikler meydana gelebilme ihtimali, uzun süre alması ve emek yoğun bir yöntem olması, MLST ise, emek yoğun ve pahalı bir yöntem olması gibi sebeplerden ötürü, çoğu laboratuvarında kolayca uygulanamamaktadır. Son yıllarda kullanılmaya başlayan çoklu bölge değişken tekrar analizi (MLVA) tiplendirme yöntemi, çeşitli patojenlerde kullanılmış ve başarı sağlamış bir tiplendirme yöntemidir [3, 15, 16, 17]. Belirli bir lokusta, kısa tekrar dizilerinin sayısındaki değişkenlik farklı DNA profillerini ayırarak epidemiyolojik çalışmalara fayda sağlamaktadır. Bu teknik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli bir teknik olup, uygulama kolaylığı, zaman kazandırması ve maliyet açısından avantaj sağlamaktadır. *S. aureus* için MLVA tiplendirme yöntemi ile ilgili var olan çalışma sayısı sınırlı olup [2, 3, 6, 8, 19] bu çalışma da *S. aureus* izolatları için altın standart olarak kullanılan PFGE yöntemi ile MLVA yöntemi karşılaştırılmış, MLVA yönteminin başarı ve kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. Deneysel çalışmalar

2.1. Bakteri izolatları

30 adet *S. aureus* izolatı Ankara Numune Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edildi. Geçmiş zamanlarda izole edilen ve -80°C de saklanan insan kaynaklı bakteri örnekleri TSA besiyerinde aktif hale getirilmiştir.

2.2. DNA izolasyonu: DNA izolasyonu için aktif hale getirilen izolatlar, nutrient broth sıvı besiyerine ekilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. DNA izolasyonu için örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üzerine 250 µl TE tampon (pH:8) eklendi. Üzerine 2 mg/ml konsantrasyonda lizostafinden 15 µl eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra, DNA easyBlood&tissue kit (Qiagen), önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı ve ürün DNA ekstraktı olarak kullanıldı [18].

MLVA moleküler tiplendirme: Yöntemin uygulamasında multipleks PCR karışımı hazırlandı. MLVA yönteminde farklı genotipik izolatları ayırmak amacıyla Sebat ve arkadaşlarının protokolünden yararlanıldı [7, 20]. Karışımda 10 µl 2 X PCR tampona, 2.5 U/µl Taq DNA polimeraz (Fermantas), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dntp, 0,5 µM SspA, 1 µM ClfA, 1 µM ClfB, 0,5 µM spA, 1,5 µM sdrCDE ve 1 µl 50 ng DNA eklendi ve

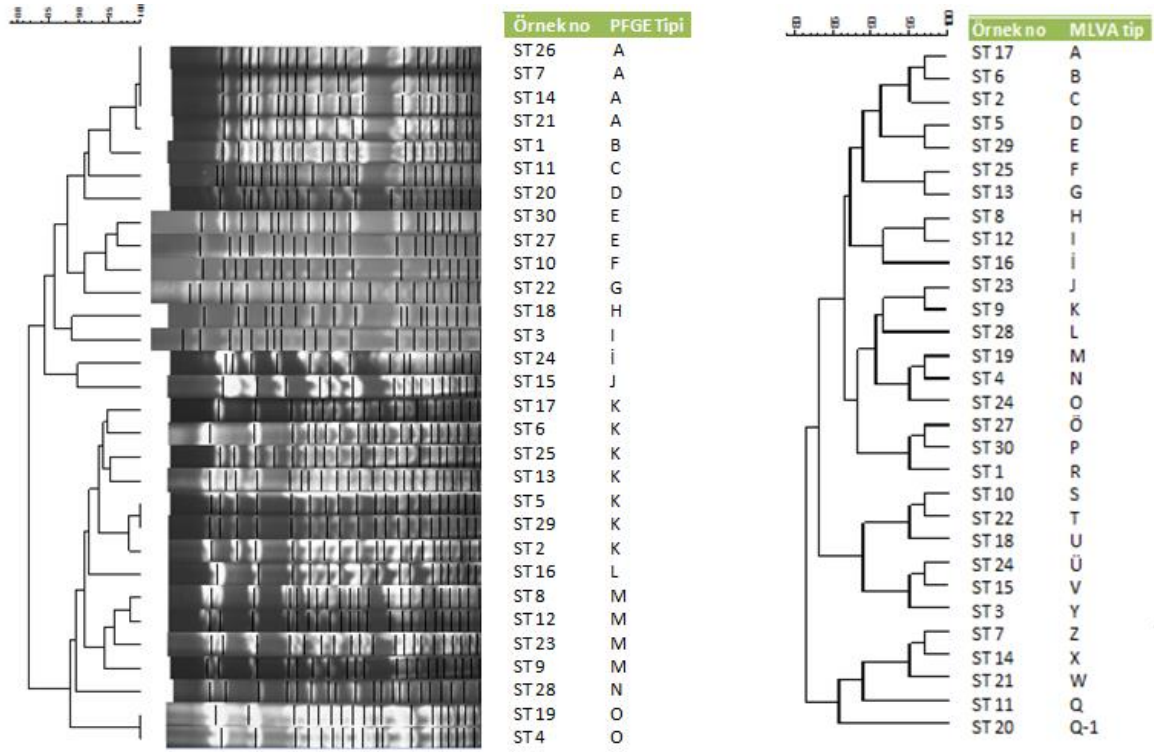
toplam hacim 20 µl' ye tamamlandı. PCR döngüleri, 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 25 döngü, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde tamamlandı [7]. Elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülüp, görüntüledi. Amplikonlar Beckman-Coulter CEQ 8000 dizileme cihazında kapiller jel elektroforezi ile analiz edildi. Fragman analizi, PeakScanner yazılımı kullanılarak yapıldı ve Bionumerics (Applied Math, Belçika) 6.0.2 versiyonlu program MLVA eklentisine kaydedilerek dendogram oluşturuldu.

PFGE moleküler tiplendirme: Çalışmada Mulvey ve arkadaşlarının optimize ettiği PFGE protokolü kullanıldı [21]. Genomik DNA 30 U/µl *Sma*I enzimi ile fragmanlara ayrıldı ve %1'lik agaroz jelde 0,5X Tris-borat-Edta (Sigma) tampon kullanılarak, CHEF-DR II (Biorad), sisteminde 24 saat 15°C'de yürütüldü. Sistem 6V/cm akım, 5,3 sn başlangıç ve 40 sn bitiş zamanları olacak şekilde ayarlandı. Küme analizi, UPGMA yöntemi ile %1 optimizasyon ve %1.5 tolerans kullanılarak Dice benzerlik katsayısı ile Bionumerics (Applied Math, Belçika) 6.0.2 versiyonlu program ile gerçekleştirildi. Suşlar Tenover ve arkadaşlarının [22] kriterleri göz önüne alınarak, ayırt edilemez, farklı ve yakın ilişkili olarak kategorize edildi.

3. Sonuçlar ve tartışma

Tamamen birbirinden bağımsız farklı zamanlarda farklı -80°C'de saklanmış *S. aureus* örneklerinde 2 moleküler tiplendirme yönteminin karşılaştırılması yapıldı. Her iki yöntem ile de *S.aureus* izolatlarının tamamı tiplendirilmiştir. MLVA için 5 değişken numaralı ardışık tekrar kullanıldı. MLVA datalarına ait cluster analizi şekil 1 (B)' de gösterilmiştir. Görsel inceleme ile farklı tipler olarak sınıflandırılan izolatlar Bionumerics programı ile gruplandırılmıştır. Çalışma da tek allele göre farklılık gösteren izolatlar dendogramda da görüldüğü üzere, farklı tip olarak kabul edilmiştir. MLVA dendogramında kümeleşme görülmeyip, her izolatın A-Q2 arasında isimlendirilen 31 farklı moleküler tiplere ait olduğu saptandı.

PFGE analizi sonunda 2 küme, 16 pulsotip elde edilmiştir. Kümelerden biri pulsotip A olup 3 izolat, diğeri pulsotip K olup 2 izolat barındırmaktadır. Ancak Tenover kriterlerinde ki bant farklılıkları göz önüne alınarak, dendogramda %90-95 arası benzerlik grubuna giren pulsotipler birbiriyle ayırtedilemez olarak kabul edilmiştir. %90-85 aralığındakiler yakın ilişkili, %85'in altında benzerlik gösterenler ise farklı pulsotip grubuna ilave edilmiştir. Buna göre, pulsotip A ve B, pulsotip E, F, G ve pulsotip K, L, M, N ve O izolatları da kendi içlerinde birbirleri ile yakın ilişkili olarak gruplandırılmıştır. PFGE datalarına ait cluster analizi Şekil 1 (A)' da gösterilmiştir.



Şekil 1. (A): *Sma*I resktiksyon endonükleaz enzimi, UPGMA algoritması ve Bionumerics 6.01 sürüm analiz programı kullanılarak oluşturulan *S. aureus* izolatlarına ait PFGE dendogramı. (B): Bionumerics 6.01 sürüm analiz programı kullanılarak elde edilen MLVA sonuçlarının dendogramı.

PFGE analizi ile aynı grupta ve birbiri ile ilişkili ve yakın ilişkili görülen örneklerin tek allelde ki tekrar sayısından kaynaklı farklılığa bağlı olarak, MLVA yönteminde birbiri ile ilişkisiz olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda, PFGE yöntemine nazaran MLVA yönteminin, *S. aureus* izolatları için, daha az zaman alan ve ayırım gücü yüksek bir yöntem olduğunu söylemek mümkündür.

Bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan altın standart yöntem PFGE yöntemi olup, son zamanlarda kullanılan yaygın tiplendirme yöntemlerinden birisi de MLVA tekniğidir. MLVA yöntemi hızlı, kullanımı kolay, yüksek verimlilikte, nisbeten düşük maliyetli olması ve çok farklı ekipman ve reaktife ihtiyaç duymaması ile büyük avantaj sağlamaktadır. PFGE yöntemi ise, ayırım gücü yüksek olmasına rağmen, düşük taşınabilirlik ve laboratuvarlar arası karşılaştırmalara uygun olmaması gibi dezavantajlara sahiptir [3].

Farklı mikroorganizmalar da PFGE ve MLVA yöntemlerinin karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Kjedsen ve arkadaşları *Salmonella enterica*'nın farklı serotiplerine MLVA ve PFGE yöntemlerini uygulamış ve *S. kentucky*'nin moleküler tiplendirmesinde PFGE yönteminin MLVA yöntemine göre ayırım gücünün fazla, ancak *S. hadar* için ise, tam tersi MLVA yönteminin PFGE yöntemine göre ayırım gücünün fazla olduğunu bildirmişlerdir [23]. Farklı çalışmalarda *S. enteritidis* ve *S. dublin* serotiplerinde MLVA yönteminin ayırım gücünün PFGE yöntemine göre daha baskın olduğu belirtilmiştir [24,25]. Enterokoklar için yapılan farklı bir çalışma da PFGE yönteminin ayırım gücünün MLVA yöntemine göre daha başarılı olduğu

sonucuna varılmıştır [26]. *S. aureus* için her iki yöntemin karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcut olup, farklı sonuçlara ulaşan araştırmalar mevcuttur. Malachowa ve arkadaşları yaptıkları çalışma da *S. aureus*'un tiplendirmesinde her iki yöntemin de başarı oranlarının benzer olduğunu belirtmişlerdir [2]. Tenover ve arkadaşları MLVA yönteminin PFGE tiplerini tahmin etmek amaçlı kullanılabileceğini vurgulamıştır [7]. Moser ve arkadaşları ise, MLVA metodunun özdeş PFGE paternlerine sahip ilgisiz suşları tanımlamak veya benzer izolatların yakın genetik kompozisyonunu doğrulamak için kullanılabileceğini belirtmiştir [19]. Rasschaert ve arkadaşları PFGE'nin ayırım gücünün MLVA yönteminden daha iyi olduğunu belirtmiştir [8]. Song ve arkadaşları *S. aureus* bakterisini tiplendirmek için yine her iki yöntemi de kullanmıştır. PFGE ile 28 alttip, MLVA yöntemi ile ise 29 alttip tespit etmişler, ayrıca bazı suşlar için PFGE yönteminin yetersiz kaldığını belirtmişlerdir [27].

Yapmış olduğumuz çalışma da, 30 adet farklı zamanlarda stoklanmış, birbiri ile ilişkisiz örneklerle her iki yöntem de uygulanmış ve 5 farklı lokusta, *S. aureus* için MLVA yönteminin ayırım gücü yüksek, kullanılabilir bir tiplendirme yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır. Buna bağlı olarak, kullanım kolaylığı, maliyetinin düşük olması gibi avantajlarına bağlı olarak, hastane içi ve hastaneler arası bulaşlarda MLVA yönteminin başarılı sonuç vereceği düşünülmektedir. Ancak örnek sayılarının çoğaltılarak, *S. aureus* için, tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması üzerine çalışmaların çoğaltılması gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Çalışma da kullanılan örneklerin teminindeki desteklerinden ötürü Doç. Dr. Gülşen Hazırolan'a ve analizlerde ki desteğinden ötürü Doç. Dr. Alper Karagöz'e teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

- [1] Ruegg, P.L., A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention, **Journal of Dairy Science**, 100, 10381–97, (2017).
- [2] Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Krzyszton-Russjan, J., Empel, J., Miedzobrodzki, J., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P.C., Hryniewicz, W., Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates, **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 7, 3095-3100, (2005).
- [3] Schouls, L.M., Spalburg, E.C., Luit, M., Huijsdens, W., Pluister, G.N., Santen-Verheuve, M.G., Heide, H.G.J., Grundmann, H., Heck, M.E.O.C., Neeling, A.J. Multiple- locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing, **Plos one**, 4, 4, e5082, (2009).
- [4] de Neeling, A.J., van den Broek, M.J., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuve, M.G., Dam-Deisz, W.D., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs, **Veterinary Microbiology**, 122, 366–372, (2007).
- [5] de Neeling, A.J., van Leeuwen, W.J., Schouls, L.M., Schot, C.S., van Veen-Rutgers, A., Beunders, A.J., Buiting, A.G., Hol, C., Ligtoet, E.E., Petit, P.L.,

- [17] Schouls, L.M., van der Heide, H.G., Vauterin, L., Vauterin, P., Mooi, F.R. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch *Bordetella pertussis* strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s, **Journal of Bacteriology**, 186, 5496–5505, (2004)
- [18] Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1991).
- [19] Moser, S.A., Box, M.J., Patel, M., Amaya, M., Schelonka, R., Waites, K.B., Multiple-locus variable number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within USA pulsed-field gel electrophoresis, **Journal of Hospital Infection**, 71, 4, 333-339, (2009).
- [20] Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., Potempa, J., New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates, **Journal of Clinical Microbiology**, 41,1801–1804, (2003).
- [21] Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., Alfa, M., Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis, **Journal of Clinical Microbiology**, 39, 3481–3485, (2001).
- [22] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan, B., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, 33 (9), 2233-9, (1995).
- [23] Kjeldsen, M.K., Torpdahl, M., Nielsen, E.M., Development and comparison of a generic multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Salmonella enterica subsp. Enterica*, **Journal of Applied Microbiology**, 119, 1707-1717, (2015).
- [24] Boxrud, D., Pederson-Gulrud, K., Wotton, J., Medus, C., Lyszkowicz, E., Besser, J. and Bartkus, J.M., Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, **Journal of Clinical Microbiology**, 45, 536–543, (2007)
- [25] Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Cassar, C.A., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E.A., Threlfall, E.J., Chappell, S.A., Davies, R.H., Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland, **Journal of Applied Microbiology**, 93, 732–744, (2002).
- [26] Top, J., Banga, N.M.I., Hayer, R., Willens, R.J., Bonten, M.J.M., Hayden, M.K., Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, **Clinical Microbiology and Infection**, 14, 363-369, (2008).
- [27] Song, M., Shi, C., Xu, X., Shi, X., Molecular typing and virulence gene profiles of enterotoxin gene cluster (egc-positive *Staphylococcus aureus* isolates obtained from various food and clinical specimens, **Foodborne Pathogen and Disease**, 13, 11, (2016).