

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA
PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. OSMAN SEZER CİRİT

SAMSUN 2009

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA
PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. OSMAN SEZER CİRİT

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. AHMET YILMAZ ÇOBAN

SAMSUN 2009

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaŐan tez danıŐmanım Doç. Dr. Ahmet Yılmaz oban'a, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Prof. Dr. Belma Durupınar'a, Prof. Dr. Murat Hökelek'e, Doç. Dr. Asuman Birinci'ye, Yrd. Doç. Dr. Çađatay Acuner'e, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına, tez çalıŐmam sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba Yıldırım'a, saygılarımı sunarım.

Hayatın her anını birlikte paylaşmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalıŐanlarına teŐekkürlerimi sunarım.

Aramızda mesafeler olsa da kalbimizin hep birlikte çarptığı, hayatımın her döneminde beni destekleyen başta annem, babam ve kardeŐim olmak üzere tüm aileme...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stafilokoklar	3
2.1.1. Tarihçesi	3
2.1.2. Sınıflandırma	3
2.1.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	4
2.1.4. Üreme Özellikleri	4
2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri	4
2.1.6. Virulans ve Patojenite	5
2.1.6.1. Kapsüler polisakkarit	5
2.1.6.2. Peptidoglikan ve teiokoik asit	5
2.1.6.3. Protein A	6
2.1.6.4. Enzimler	6
2.1.6.5 Hemolizinler	7
2.1.6.6. Toksinler	8
2.1.7. Epidemiyoloji	8
2.1.8. <i>S. aureus</i> İnfeksiyonları	9
2.1.9. Tanımlama	10
2.1.9.1. Gram boyama	10
2.1.9.2. Katalaz testi	10
2.1.9.3. Glikoz fermantasyonu	10
2.1.9.4. Lizostafine duyarlılık	10

2.1.9.5. Eritromisin varlığında gliserolden asit üretimi	10
2.1.9.6. Furazolidona duyarlılık	10
2.1.9.7. Basitrasine duyarlılık	10
2.1.9.8. Koagülaz testi	11
2.1.9.9. DNaz testi	11
2.1.9.10. Mannitol fermentasyonu	11
2.2. Metisilin Direnci	11
2.2.1. <i>mecA</i> geni	12
2.3. Panton Valentin Lökosidin	15
2.4. TK-MRSA HK-MRSA İnfeksiyonlarının Karşılaştırılması	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Stafilokokların Tanımlanması	26
3.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesi	26
3.2.1. VITEK2 Compact Otomatize Sistemi	26
3.3. Genotipik Yöntemler	27
3.3.1. <i>S. aureus</i> bakteri hücrelerinden DNA ekstraksiyonu	27
3.3.2. Çalışmada kullanılan primer dizileri	28
3.3.3. PZR Optimizasyonu	28
3.3.4. Multipleks PZR Yöntemiyle <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> genlerinin Amplifikasyonu ve Gen Bölgelerinin Saptanması	30
3.3.5. PZR Yöntemiyle (Single-target) <i>lukS/F-PV</i> geninin Amplifikasyonu ve Gen Bölgesinin Saptanması	31
3.3.6. DNA Elektroforezi	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo I	: TK-MRSA risk grupları	20
Tablo II	: CDC kriterleri	21
Tablo III	: TK-MRSA ile HK-MRSA arasındaki farklılıklar	24
Tablo IV	: TK-MRSA özellikleri ve önerilen alt tanımlamalar	25
Tablo V	: <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> primer dizileri	28
Tablo VI	: MgCl ₂ optimizasyonu	29
Tablo VII	: <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli 25 µl PZR reaksiyon karışımı	30
Tablo VIII	: <i>lukS/F-PV</i> gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli 40.3 µl PZR reaksiyon karışımı	31
Tablo IX	: <i>S. aureus</i> 'ların izole edildiği materyallerin dağılımı	33
Tablo X	: Gönderilen materyallerin servislere göre dağılımı	35
Tablo XI	: MRSA izolatlarının 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> genlerinin PZR sonuçları	40
Tablo XII	: MSSA izolatlarının 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> genlerinin PZR sonuçları	42

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1 : SCCmec tip I	13
Şekil 2 : SCCmec tip II	13
Şekil 3 : SCCmec tip III	14
Şekil 4 : SCCmec tip IV	14
Şekil 5 : SCCmec tip V	14
Şekil 6 : PVL doku nekroz modeli	17
Şekil 7 : PVL'nin indüklediği PMNL apoptozisi	17
Şekil 8 : PVL üreten TK-MRSA'ların ortaya çıkış modeli	22
Şekil 9 : Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından gönderilen materyallerin dağılımı	34
Şekil 10 : Gönderilen materyallerin servislere göre dağılım grafiği	36
Şekil 11A : <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> gen bölgeleri için 2µl DNA kulanılarak elde edilen 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri	37
Şekil 11B : <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> gen bölgeleri için DNA optimizasyonu sonucu elde edilen 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri	37
Şekil 12 : <i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA, <i>lukS/F-PV</i> ve <i>mecA</i> gen bölgeleri için MgCl ₂ optimizasyonu ile oluşan 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri	38
Şekil 13 : PVL (+) ve PVL (-) MRSA-MSSA izolatlarının 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri	39
Şekil 14 : <i>S. aureus</i> izolatlarında saptanan 433 bp'lik <i>lukS/F-PV</i> gen bölgeleri	39

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ark	: arkadaşları
CDC	: “Centers for Disease Control and Prevention” Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
HK-MRSA	: Hastane kaynaklı MRSA
HIV	: “Human Immunodeficiency Virus” İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum inhibe edici konsantrasyon
MLST	: “Multilocus sequence typing” Multi lokus dizi tiplendirme
MRSA	: Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PFGE	: Pulsed field jel elektroforez
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PVL	: Panton Valentin Lökosidin
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal RNA
SCC<i>mec</i>	: Stafilokok kaset kromozom <i>mec</i>
TE	: Tris HCl-EDTA
TK-MRSA	: Toplum kaynaklı MRSA
TŞST-1	: Toksik şok sendromu toksini-1

ÖZET

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KLİNİK İZOLATLARINDA PANTON-VALENTİN LÖKOSİDİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Staphylococcus aureus, en virulan stafilokok türü olup yatan hastalardan en sık, ayaktan hastalardan ikinci sıklıkta izole edilen patojendir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) sadece sağlık kuruluşlarında değil aynı zamanda toplumda da en önemli halk sağlığı sorunu olarak yerini korumaktadır.

Toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) izolatları genellikle stafilokok kaset kromozom *mec* (*SCCmec*) tip IV elemanı taşımaktadırlar ve beta laktam dışı çeşitli antibiyotiklere duyarlıdırlar. Bununla birlikte toplum kaynaklı izolatların bir kısmı sitotoksin üretimiyle lökosit yıkımı ve doku nekrozuna yol açan Panton-Valentin Lökosidin (PVL) *lukS* ve *lukF* genlerini taşımaktadırlar. PVL üreten *S. aureus* izolatları daha çok deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla ilişkilidir. Buna ilave olarak nekrotizan pnömoni gibi hayatı tehdit eden invaziv hastalıklara da neden olabilmektedir. Hem metisiline duyarlı hem de metisiline dirençli PVL üreten *S. aureus* izolatlarına bağlı infeksiyonların son on yıl içinde artış göstermesi PVL toksininin tanımlanmasına olan ilgiyi doruğa çıkarmıştır. Ayrıca, *S. aureus* izolatlarında PVL varlığının tanımlanması bu izolatlara bağlı yayılımı sınırlamada önemli katkı sağlayabilir.

Bu çalışmada, Şubat 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 130 MRSA ve 20 MSSA izolatu test edildi. Tüm izolatların identifikasyonu VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle yapıldı. VITEK 2 tarafından tanımlanan *S. aureus* izolatları ile bu izolatlardaki metisilin direncinin doğrulanması multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapıldı. PVL gen varlığı hem multipleks PZR hem de single-target PZR ile de test edildi. Çalışma sonucunda, 3 izolatta PVL pozitif bulundu. Bunlardan ikisi MRSA, diğeri ise MSSA izolatu idi. PVL pozitif MRSA izolatının biri yara örneğinden diğeri kan kültür örneğinden tanımlandı. PVL pozitif MSSA izolatu ise idrar örneğinden tanımlandı. PVL pozitif izolatların üçü de tetrasikline dirençliydi. Kan kültüründen izole edilen PVL pozitif MRSA izolatu gentamisin ve siprofloksasine de dirençli bulunurken, diğeri PVL pozitif MRSA izolatu duyarlı bulundu.

Sonuç olarak, PVL pozitif izolatların hastalıklarla ilişkisi, antimikrobiyal direnç profili ve yayılımlarının izlenmesi amacıyla sürveyans son derece önemlidir. Ayrıca, PVL pozitif izolatların prevalansını ve genetik özelliklerini belirlemek, bu izolatların hem toplumda hem de hastane ortamında yayılımlarını önlemek için alınacak önlemlerin belirlenmesi amacıyla ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: *Staphylococcus aureus*, metisilin, PVL, TK-MRSA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PANTON-VALENTINE LEUKOCIDINE PRESENCE IN THE CLINICAL STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus aureus, the most virulent *Staphylococcus* species, is also the most prevalent pathogen isolated from hospitalized patients and the second most common from patients in outpatient settings. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) remain a major threat to public health, not only in the healthcare setting but also in the community.

Community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) isolates commonly harbor the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV element and are susceptible to multiple non beta lactam antibiotics. However some of the community associated strains carry the Pantone-Valentine leukocidin (PVL) genes *lukS* and *lukF*, which produce cytotoxins that cause leukocyte destruction and tissue necrosis. *S. aureus* isolates that produce PVL are mostly associated with skin and soft tissue infections. In addition, it can also cause life threatening invasive infections, such as necrotizing pneumonia and necrotizing fasciitis. Infections with PVL producing isolates of both methicillin-susceptible and resistant *S. aureus* have increased over the last decade and peaked interest in the detection of the PVL toxin. Moreover, defining the presence of PVL in *S. aureus* isolates can provide a significant contribution to limiting the dissemination of this isolates.

In this study, 130 MRSA and 20 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates were tested among various clinical samples between February 2006 and June 2008. Identification of all isolates were made by VITEK-2 Compact (bioMérieux, France) automated system. Confirmation of *S. aureus* isolates which were determined by VITEK-2 and the methicillin resistance of this isolates were made by multiplex PCR. The presence of PVL was tested by both multiplex PCR and single target PCR. PVL positivity was determined in 3 isolates. Two of the isolates were from MRSA isolates, one was from MSSA isolates. One of the PVL positive MRSA isolate was recovered from wound specimen whereas the other was from blood culture. PVL positive MSSA

isolate was recovered from urine specimen. All of the three PVL positive isolates were resistant to tetracycline. One of the PVL positive MRSA isolate which was recovered from blood culture was resistant to gentamycine and ciprofloxacin while the other PVL positive isolate was susceptible.

Further studies are needed to learn about the prevalence and genetic characteristics of PVL positive isolates and to prevent PVL positive isolates both in the hospital environment and in community.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, methicillin, PVL, CA-MRSA

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus folikülit ve fronkül gibi deri infeksiyonlarından, selülit, abse, osteomyelit, pnömoni, sepsis ve endokardit gibi derin yerleşimli ve hayatı tehdit edici durumlara yol açabilen birçok hastalığa neden olabilmektedir (61).

Metisilin'in 1960'lı yılların başında kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'lar ortaya çıkmıştır (58). MRSA 1990'lı yıllara kadar sadece hastane infeksiyonlarından sorumlu iken, daha sonraları hastane veya hastane personeliyle ilişkisi olmayan ve herhangi bir risk faktörü bulunmayan hastane dışı kişilerde de tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır (46). Son yıllarda Toplum Kaynaklı MRSA (TK-MRSA) infeksiyonları düzenli artış göstererek önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya başlamıştır (14). Bu mikroorganizmayı ve sebep olduğu infeksiyonları tanımlayabilmek için oldukça fazla sayıda çalışma bulunmakla beraber TK-MRSA'yı tanımlamada kullanılan terminolojide henüz tam bir fikir birliğine varılamamıştır. Bu konudaki anlaşmazlık, yeni ortaya çıkan TK-MRSA'nın hastanelerde yayılımıyla doruğa ulaşmıştır (60).

TK-MRSA'nın sağlık kuruluşlarındaki yayılımı yeni ortaya çıkan bir problemdir ve yakın zamandaki salgınlarla ilgili raporlar erken tanının ve acil kontrol önlemlerinin önemini vurgulamaktadır. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin birçok eyaletinde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilen MRSA oranı %50'lerin üzerine çıkmıştır. Daha da endişe verici olanı TK-MRSA'ların ilaçlara direnç oranlarının artması, yeni coğrafi alanlarda ve popülasyonlarda yayılmasıdır. Göçler ve yabancı ülkelere seyahat muhtemelen Avrupa'daki yayılımın hızında anahtar rol oynamaktadır (66).

Ciddi TK-MRSA infeksiyonlarında ve buna bağlı ölümlerdeki hızlı artış bu potansiyel virulan patojenin yayılımının kontrolünde Panton-Valentin Lökositin (PVL) geni taşıyan *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasının önemini işaret etmektedir. MRSA izolatlarında PVL geninin saptanması TK-MRSA izolatlarının varlığını kanıtlayabilmektedir. Bazı toplum kaynaklı *S. aureus* izolatları *mecA* genini taşımalarına rağmen metisilin minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerleri çok düşük olabilmektedir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde bunlar yanlışlıkla metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle PVL

üreten MSSA izolatlarında *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmesi önerilmektedir (34). Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA izolatlarında metisilin direncine yol açan *mecA* geninin ve PVL S/F'yi kodlayan *lukS/F-PV* geninin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilokoklar

2.1.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk kez 1878’de Robert Koch tanımlamış, 1880’de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881’de Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu bildirmiştir. Rosenbach 1884’te beyaz renkli kolonileri *S. albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir (11).

Antibiyotik çağının başlangıcından beri antibiyotik kullanımının oluşturduğu seçici baskı stafilokoklarda çok kısa sürede direnç gelişmesine yol açmıştır. Bu durum 1941’de penisilin G’nin tedaviye girmesi ile beta-laktamaz üretimine bağlı direnç gelişmesi ile başlamış, bundan sonra da her kullanıma giren antibiyotiğe karşı direnç gelişimi ile sürmüştür. Epidemik klonlar, henüz 1950’li yıllarda birbiri ardına penisilin G, streptomisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve daha sonra da makrolidlere direnç kazanmıştır (34).

Penisiline dirençli *S. aureus*’un neden olduğu infeksiyonların tedavisi için 1959 yılında metisilin kullanıma girmiştir. 1961 yılında metisiline direnç kazanan *S. aureus* izolatu İngiltere’den bildirilmiş, çok geçmeden diğer Avrupa ülkelerinden ve daha sonra Japonya, Avustralya ve ABD’den MRSA izolatları rapor edilmiştir. MRSA günümüzde dünya genelinde birçok hastanede önemli bir problem olmasının yanısıra bakımevleri ve toplumda da artan oranda görülmektedir (24).

2.1.2. Sınıflandırma

Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’nin 1986 baskısında “*Micrococcaceae*” ailesi 4 cins içermektedir: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*. Sonraki genetik çalışmalar (DNA-ribozomal RNA (rRNA) hibridizasyon, 16S rRNA sekans) ve kemotaksonomik analizler (hücre duvar kompozisyonu, hücresel yağ asitleri) bu mikroorganizmaların farklılığını belgelemiş olup bu dört cinsin tek bir ailede birleştirilemeyeceğini tespit etmişlerdir (50). *Staphylococcus* türleri yeni tanımlanmış olan *Macrococcus* türleri ile daha yakın ilişkili olmasına rağmen *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* ile de nispeten yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir (3).

2.1.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Stafilokoklar hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, Gram pozitif koklardır (50). *Staphylococcus* cinsinin üyeleri düzensiz üzüm benzeri kümeler oluşturan daha az sıklıkla tek ve çift, tetradlar ve kısa zincirler (3 veya 4 hücreli) oluşturan koklardır (3). Gram boyama taze kültürlerden uygulanmalıdır çünkü çok eski kültürler kristal viyoleyi tutma özelliklerini kaybederek Gram değişken ya da Gram negatif görülebilirler (26). Stafilokoklar sıklıkla kapsülsüzdür ya da sınırlı bir kapsüle sahiptirler (61).

2.1.4. Üreme Özellikleri

Micrococcaceae %5 koyun kanlı ve çikolatamsı agarlarda ürer, fakat MacConkey agarda üremez. Sıvı kan kültür sistemlerinde ve tiyoglikolat ile beyin-kalp infüzyon besiyeri gibi genel besleyici sıvılarda ürerler.

Klinik materyalden stafilokokları izole etmek için selektif besiyeri kullanılabilir. Bu durum için mannitol tuzlu agar sıklıkla kullanılır. Bu agar yüksek konsantrasyonda tuz (%10), mannitol şekeri ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısını içerir. Bu besiyerinde tuz varlığında üreyebilen *S. aureus* gibi organizmalar mannitolü fermente ederek sarı hale ile çevrili koloniler oluşturur. Gözle görülür üreme, 35° C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilen %5 koyun kanlı ve çikolatamsı agarlarda çoğunlukla inokülasyonun 24. saati içinde gerçekleşir. Mannitol tuzlu agar ve diğer selektif besiyerlerinde üreme tespit edilmeden önce en az 48-72 saat inkübasyon gerekli olabilir (26).

Bu bakterilerin optimal üreme ısıları 30-37°C ve pH: 7-7.5'tur. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün, 1-4 mm çapında, hafif konveks koloniler oluştururlar. Gliserol monoasetat gibi yağ asitleri ile zenginleştirilmiş besiyerinde 37°C'de üretildiklerinde, karotenoidlerinden dolayı pigment oluştururlar. Anaerob koşullarda ve buyyonda pigment oluşturmazlar. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* tebeşir beyazı rengine koloniler oluşturur (11). *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışında çoğu tür fakültatif anaerobtur (50).

2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri

Başta glikoz olmak üzere birçok karbohidratı fermantatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit sentezler, gaz oluşturmazlar. Mannitole etkileri değişken olup özellikle *S. aureus* bu şekere etkilidir. Tüm stafilokoklar ve mikrokoklar özellikle

glikozlu besiyerlerinde katalaz olumludurlar (5). Nadir izolatlar dışında stafilocoklar katalaz pozitifdir. *S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulus* izolatları dışında tüm diğer stafilocok türlerinin modifiye oksidaz testi negatiftir. *S. aureus*, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* lam koagülaz testi pozitif olabilirken, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans* tüp koagülaz testi pozitif olabilir (50).

2.1.6. Virülans ve Patojenite

S. aureus virülansı en yüksek olan stafilocok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır (22).

***S. aureus* virülans faktörleri**

- Kapsüler polisakkarit
- Peptidoglikan ve teikoik asit
- Protein A
- Enzimler (katalaz, koagülaz, fibrinolizin, hiyalüronidaz, lipaz, nükleaz, beta laktamaz)
- Hemolizinler (α hemolizin, β hemolizin, σ hemolizin, γ hemolizin, lökosidin)
- Toksinler (eksfolyatif toksin, enterotoksinler (A-E, H-I), toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1) (50)

2.1.6.1. Kapsüler Polisakkarit

S. aureus klinik izolatlarının %90'ından fazlası polisakkarit kapsül meydana getirir ve bunların içinde 11 serotip bildirilmiştir. *S. aureus*'un kapsül tip 1 ve tip 2 izolatları fazla miktarlarda polisakkarit üretir ve kültür plaklarında mukoid görülür. Kapsül tip 5 ve 8 klinik infeksiyonların %75'inden fazlasından sorumludur (61). Organizmanın polimorfonükleer lökosit (PMNL)'lerce sindirimini engelleyebilen bu ekzopolisakkarit, konak hücrelere ve protez cihazlara bağlanmada rol oynar (50).

2.1.6.2. Peptidoglikan ve Teikoik asit

Diğer gram pozitif bakterilerde olduğu gibi stafilocokların da hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Peptidoglikan tabaka N-asetil glikozamin ve N-asetil muramik asit polimerlerinden oluşur. N-asetil muramik asite bağlı olan pentapeptid rezidüleri, bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasındaki pentaglisin köprüleri ile birbirine bağlanır. Sadece Gram-

pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit stafilokokların hücre duvarında yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar (81). Peptidoglikan ve teikoik asid virulansı arttırıcı bir takım biyolojik özelliklere sahiptir. Bu özellikler komplemanı aktive etme yeteneği, PMNL'lerce kemotaksisin arttırılması, insan monositlerince interlökin-1 üretiminin sağlanması ve opsonik antikor üretiminin stimülasyonudur (50).

2.1.6.3. Protein A

IgG3 hariç tüm insan IgG alt sınıflarının Fc bölgesine bağlanma yeteneğindedir. Protein A immunojeniktir ve ona karşı antikorlar ciddi *S. aureus* enfeksiyonlu bireylerde bulunur (50).

2.1.6.4. Enzimler

Katalaz: Bu mikroorganizmaların fagositik hücrelerce sindiriminden sonra fagositik hücrelerin içerisinde mikroorganizma tarafından üretilen katalaz enzimi toksik hidrojen peroksidin ve miyeloperoksidaz sistemi tarafından oluşturulan serbest radikallerin inaktivasyonuna yol açabilir (50).

Koagülaz: İki farklı şekilde olabilir. Bağlı koagülaz ("clumping factor") adı verilen yapı *S. aureus*'un hücre duvarında bulunur ve fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür. Serbest koagülaz ise bakteriden dışarıya salgılanır, globulin yapısındaki bir plazma faktörü ile birleşerek trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır (81).

Fibrinolizin: Fibrin pıhtısını parçalar ve enfeksiyonun bitişik dokuda yayılımını kolaylaştırır (50).

Hiyalüronidaz: Bağ dokusunun aselüler matriksindeki asit mukopolisakkaritlerden olan hiyalüronik asidi hidrolize eden enzimlerdir (81).

Lipaz: Kronik fronküle neden olan *S. aureus* izolatlarının kutanöz ve subkutanöz dokularda organizmanın yayılımına yardımcı olabilen, potansiyel lipaz üreticileri oldukları bulunmuştur (50).

Nükleaz: Deoksiribonükleaz (DNaz) enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (81).

Beta laktamaz: Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma beta laktamaz üretimidir (81). İmmunolojik ve substrat spesifik çalışmalar *S. aureus*'un en

az üç farklı tip beta laktamaz salgıladığını göstermiştir. Bu enzimlerin üretimi indüklenebilir ya da yapısalıdır (50).

2.1.6.5. Hemolizinler

Alfa hemolizin: İlk kez 1900'de Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır (11). İnsan PMNL'leri de içeren çok çeşitli hücreler üzerinde öldürücü etkisi vardır ve çeşitli hayvan türlerinin eritrositlerini parçalayabilir. Toksin 33 kDa moleküler ağırlığında bir protein olup geç logaritmik üreme esnasında besiyerinin içine salınır. Monomerler hedef hücre membranı ile etkileşerek santral bir porla silindirik heptamerler oluşturur. Heptamerik alfa hemolizin kümelerince por açılır ve potasyum iyonları ile diğer küçük moleküllerin hücre dışına, sodyum ve kalsiyum iyonlarının hücre içine girişine izin verir, ozmotik şişme ve hücrenin parçalanmasına yol açar. Subkutanöz enjeksiyonda dermonekrotiktir ve intravenöz uygulandığında hayvanlar için öldürücüdür. Nörotoksisite de alfa hemolizinin bir özelliğidir. Bu toksin koyun kanlı agar da üreyen bazı *S. aureus* suşlarının kolonileri etrafında eritrositlerin hemolizi sonucu gözlenen zonun oluşumundan sorumludur (50, 32)

Beta hemolizin: Glenny ve Stevens tarafından 1935'de tanımlanmıştır (11). Alfa toksin ile birlikte sfingomyelin üzerine etkili olan beta toksin (sfingomyelinaz C) invaziv stafilokok infeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve abse oluşumundan sorumlu en önemli toksindir. Beta toksin sıcak-soğuk hemolizin olarak da bilinir ve başlangıçta belli bir miktar hemoliz oluşturan stafilokokların hemoliz yapma aktiviteleri bu toksin nedeniyle soğuk ısılarda artar. Beta toksin, aynı zamanda B grubu streptokoklar ile *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemolizini artırıcı etkiye sahip olan CAMP faktörle etkileşen ve sinerjik hemolize sebep olan yapıdır (81).

Gama hemolizin: Gama hemolizin Smith ve Price tarafından 1938'de tanımlanmış, Möllby Wadström tarafından elde edilmiştir (11). Gama hemolizin her birinin moleküler ağırlığı 32-35 kDa arasında değişen üç proteine sahiptir. Bu proteinlerin her biri PVL'nin iki proteininden biriyle etkileşime girerek biyolojik aktiviteye sahip altı farklı kombinasyon oluşturur. Bu beş proteinden hiçbirisi kendi başına hemolitik ya da lökotosik aktiviteye sahip değildir. Bu iki bileşenli altı toksin değişken derecede hemolitik aktivite gösterirken, tümü etkin şekilde lökositleri parçalayabilir. Lökositidal aktivite direkt insan PMNL membranlarına etkiyle

sitoplazmanın degranülasyonu, hücre şişmesi ve parçalanmaya neden olur. Bu toksinler por oluşumunu sağlayarak etki gösterirler, bu nedenle potasyum ve diğer katyonlara hücrel geçirgenliği değiştirirler (50) .

Delta hemolizin: Bu toksini 1947’de Williams ve Harper tanımlamıştır (11). Moleküler ağırlığı 3 kDa olan bir proteindir. Delta hemolizin, deterjan benzeri etkiyle hücre membranında hasara yol açar, boyutları zamanla artan kanallar oluşturarak membranla etkileşir ve hücre içeriği dışarıya çıkar (50).

2.1.6.6. Toksinler

Epidermolitik toksinler (eksfolyatif toksin): Her biri 24 kDa moleküler ağırlığında ekfoliyatif toksin A ve ekfoliyatif toksin B olmak üzere iki proteinden oluşur. Bu iki molekül, biyokimyasal ve immunolojik olarak farklıdır fakat benzer biyolojik aktivitelere sahiptirler. Ekfoliyatif toksin A kromozomal olup ısıya dayanıklı bir protein iken ekfoliyatif toksin B plazmid orjinli ve ısıya duyarlıdır. Bu toksinlerden birini ya da her ikisini üreten suşlar “stafilokokal soyulmuş deri sendromundan” sorumludur. Bu proteinler proteolitik aktiviteye sahiptirler (50). Toksinler epidermisteki stratum granulosum tabakasını oluşturan hücrelerdeki desoglein I reseptörlerine bağlanırlar. Bu bağlanma desmozomlar aracılığı ile birbirlerine bağlı olan granüler hücrelerin intersellüler bağlarının kopmasına ve stratum granulosumun derinin alt tabakalarından ayrılmasına neden olurlar (81).

Enterotoksinler: A-E, H ve I enterotoksinleri üretirler. Bu toksinler ABD’de besin zehirlenmelerinin olası en sık nedeni olan stafilokokal besin zehirlenmelerinin klinik özelliklerinden sorumlu ısıya dayanıklı moleküllerdir (50). En sık besin zehirlenmesine neden olan tip enterotoksin A’dır. Enterotoksin B ise nadir görülen stafilokoksik psödomembranöz enterokolit tablosuna neden olmaktadır (81).

TŞST-1: Özellikle adet görme sırasında tampon kullanan kadınlarda veya yara enfeksiyonu bulunan kişilerde toksik şoka neden olur (71).

2.1.7. Epidemiyoloji

S. aureus doğumdan itibaren göbük, perine ve deriye kolonize olur (22). Normal florada kalıcı ya da geçici üye olarak bulunabilir. Nazal taşıyıcılık oranı hem toplumda hem de hastane çalışanlarında %10-40 arasında değişir. *S. aureus*’un nazal taşıyıcılığı, özellikle MRSA’da hem kalıcılık hem de çoklu ilaç dirençli stafilokokun yayılımı anlamına gelmektedir (61).

2.1.8. *S. aureus* İnfeksiyonları

Stafilokok infeksiyonlarında tipik lezyon, fronkül ya da lokalize deri abseleridir. Bakteri kıl folikülüne yerleşir ve doku nekrozuna neden olur. Bu odaktan lenfatikler ya da kan akımıyla yayılarak vücudun diğer kısımlarında infeksiyon oluşturur. Besin zehirlenmeleri, toksik şok sendromu ve stafilokokal haşlanmış deri sendromu ise gerçekte infeksiyon olmayıp, stafilokokların salgıladığı bir ekzotoksin aracılığıyla gelişen hastalıklardır (82).

Toksin aracılı hastalıklar: Toksin aracılı hastalıklar tipik olarak stafilokokal haşlanmış deri sendromu, stafilokokal toksik şok sendromu ve stafilokokal besin zehirlenmesini içerir. Süperantijen özelliği taşıyan çeşitli toksinlerin aracılık ettiği hastalıklardır. Hastalık toksin aracılı olduğundan semptomlardan sorumlu olan bakteri hastalıklı alanda ya da kan kültürlerinde sıklıkla bulunmaz (61).

Deri ve yumuşak doku infeksiyonları: *S. aureus*'un deri ve yumuşak doku infeksiyonları tutulan anatomik bölgeye bağlı olarak sınıflandırılan birtakım klinik antiteleri: impetigo diye adlandırılan epidermidis infeksiyonu; folikülit diye adlandırılan yüzeysel dermis infeksiyonu; fronkül, karbonkül ve hidradenitis süpürativa gibi isimlendirilen derin dermis infeksiyonu; erizipel, selülit ve fasiit olarak isimlendirilen dokuların subkutanöz infeksiyonlarını içermektedir (61).

Bakteriyemi: Toplumdan kazanılmış stafilokok bakteriyemisi genellikle selülit, osteomyelit, endokardit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırken, hastane kaynaklı stafilokok bakteriyemisi daha çok kataterlerden ve diğer invaziv girişimlerden kaynaklanmaktadır (22).

Endokardit: Doğal kapaktaki infektif endokardit infeksiyonu *S. aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından birisidir (61).

Menenjit: *S. aureus*'a bağlı menenjit, bakteriyemi komplikasyonu, cerrahi ya da yaralanmaya bağlı lokal travmayı takiben ya da intratekal pompa implant kolonizasyonu sonucunda gerçekleşebilir (50).

Perikardit: Hematojen yolla ya da penetre göğüs travmasına bağlı lokal infeksiyona sekonder olarak ortaya çıkabilir (50).

Akciğer infeksiyonları: *S. aureus*'un neden olduğu akciğer infeksiyonları aspirasyondan dolayı ya da bir başka bölgeden hematojen yayılımla ortaya çıkabilir (50).

Osteomyelit: Hematojen veya komşuluk yolu ile yayılabilir (22).

Septik artrit, septik bursit ve piyomiyozit: *S. aureus* çocuklarda septik artrit ve erişkinlerde nongonokokal artrit en sık nedenidir. Septik bursit en sık basınç alan bölgelerde lokalizedir (61).

2.1.9. Tanımlama

2.1.9.1. Gram boyama: Stafilokokların tümü gram pozitifdir (5).

2.1.9.2. Katalaz testi: Stafilokoklar ve mikrokoklar; streptokoklar, enterokoklar ve streptokok benzeri bakterilerden katalaz testi ile ayrılırlar. Bu test sitokrom oksidaz enziminin varlığını gösterir. Katalaz testi %3'lük hidrojen peroksit varlığında lam üzerinde uygulanır. Hemen ortaya çıkan kuvvetli kabarcıklar, hidrojen peroksidin bakteriye ait katalaz enzimiyle su ve oksijen gazına dönüşümünü sağladığının göstergesidir (50).

2.1.9.3. Glikoz fermantasyonu: Bu test nonfermentatif gram negatif basiller için olan oksidasyon-fermentasyon testlerine benzer biçimde uygulanır (50). *Staphylococcus* cinsi fermantatif etki gösterir (5).

2.1.9.4. Lizostafine duyarlılık: Lizostafin, stafilokok hücre duvarında bulunan peptidoglikanın glisinden zengin pentapeptit çapraz bağlarını ayıran bir endopeptidazdır. Bu aktivite hücreyi ozmotik lizise duyarlı hale getirir. *S. aureus*, *S. simulans*, *S. cohnii* ve *S. xylosus* gibi birtakım türler lizostafine daha duyarlıdır (50).

2.1.9.5. Eritromisin varlığında gliserolden asit üretimi: Stafilokoklar asit üretirken mikrokoklar üretemezler (50).

2.1.9.6. Furazolidona duyarlılık: Stafilokoklar furazolidon tarafından inhibe edilir ve 15 mm ya da daha fazla zon gösterirken, mikrokoklar dirençlidir ve 6-9 mm arası zon gösterirler (50).

2.1.9.7. Basitrasine duyarlılık: Stafilokoklar dirençliyken mikrokoklar duyarlıdır ve 10 mm ya da daha fazla zon açarlar (50).

2.1.9.8. Koagülaz testi: *S. aureus*'un tanımlanmasında kullanılan en güvenilir testtir (50).

Lam koagülaz testi: *S. aureus*'un birçok suşu hücre duvar yüzeyinde bağlı koagülaz ya da "clumping faktöre" sahiptir. Bu faktör plazmadaki fibrinojenle direkt reaksiyona girerek hızlı hücre aglütinasyonuna neden olur. Lam koagülaz testinde negatif olan herhangi bir suş tüp koagülaz testi ile doğrulanmalıdır, çünkü clumping

faktörü eksik suşlar genellikle serbest koagülaz salgırlar. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp *schleiferi* gibi bazı koagülaz negatif türler de clumping faktör üretir ve lam testi pozitif olabilir (50).

Tüp koagülaz testi: 35°C’de 4 saat inkübasyondan sonra test negatifse oda ısısında tutulmalıdır ve 18-24 saat sonra tekrar değerlendirilmelidir. Nadiren *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilir ve bazı hayvan izolatları (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) tüp koagülaz pozitif olabilir (50).

2.1.9.9. DNaz testi: *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktivitelere sahip hem DNaz hem de termostabil nükleaz üretir (50).

2.1.9.10. Mannitol fermentasyonu: *S. aureus*, *S. epidermidis* ve diğer koagülaz negatif türlerin tersine mannitolü fermente edebilir (50).

2.2 METİSİLİN DİRENCİ

1959 yılında penisilinazın amid bağı ulaşımını engellemek amacıyla, benzilpenisilindeki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesiyle metisilin elde edilmiştir. Fakat klinik kullanımdan kısa bir süre sonra, 1961 yılında ilk MRSA izolatı bildirilmiştir. Oksasilinin minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK)’inin $\geq 4\mu\text{g/ml}$ olması halinde metisilin direncinden söz edilir (83).

Metisilin direncinden sorumlu mekanizmalar başta *mecA* geni varlığına bağlı PBP2a yapımı olmak üzere penisilin bağlayan protein (PBP)’lerin beta laktam antibiyotiklere afinitelerinde azalma ve beta laktamazların aşırı yapımıdır (83,36). PBP2a proteini PBP2 ve PBP3’ün işlevini yürütemekte, ayrıca tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. *mecA* geninin ifadesi stafilokoklar arasında farklılık göstermektedir. Bazılarında heterojen direnç söz konusu olup, popülasyondaki hücrelerin küçük bir bölümü dirençli, çoğunluğu ise duyarlıdır. *mecA*’nın homojen olarak ifade edildiği izolatlarda ise tümü dirençlidir. Diğer beta laktamlar için kullanılan test koşulları uygulandığında heterodirençli izolatlar gözden kaçabilmektedir. Beta laktam antibiyotiklerden hiçbiri PBP2a’ya bağlanamamaktadır. Bu nedenle metisiline dirençli olan izolatlar tüm beta laktamlara dirençli olarak kabul edilmelidir (35).

Birçok ticari ve otomatize sistemde genellikle, düşük inokulum kullanılması ve inkübasyon süresinin kısa olmasına bağlı olarak stafilokolarda metisilin direncinin saptanması sık olarak sorun olmaktadır (45).

2.2.1. *mecA* Geni

MRSA genetik olarak MSSA'dan, kromozomunda bulunan *mec* elemanı olarak tanımlanmış 40-60 kb'lık bir deoksiribonükleik asit (DNA) parçası ve 76 kDa'luk PBP2a'yı (diğer adıyla PBP2') kodlayan *mecA* geni varlığı nedeniyle ayrılmaktadır. *mecA* geninin *S. sciuri*'den köken aldığı düşünülmektedir. *S. sciuri*'deki *mec* geni ile MRSA'daki *mec* geninin ürünleri arasında %88 aminoasit homolojisi olduğu belirlenmiştir (83).

mecA geni tüm MRSA izolatlarında bulunan bir mobil genetik elemanın parçasıdır. Katayama ve ark. (44) *mecA*'nın stafilokok kaset kromozom *mec* (*SCCmec*) olarak tanımlanan bir genomik adanın parçasığı olduğunu göstermişlerdir (52). *SCCmec* yapısı, *S. aureus* kromozomlarının replikasyon bölgesindeki attB_{scc} olarak adlandırılan bölgede, fonksiyonu bilinmeyen *orfX* geni ile birleşmiş olarak bulunmaktadır. Bu yapı bakteriyofaj, patojenite adaları ve konjugatif transpozonlara yapısal olarak benzemektedir. Fakat bunlar yapısal ve virulanstan sorumlu genler içermemektedirler. Sadece beta laktam veya beta laktam dışı antibiyotikler için direnç geni taşımaktadırlar. *SCCmec* elementleri, faj transdüksiyonu veya diğer genetik transfer sistemleri ile taşınabilmektedir (44,46). Bu adacıklarda *mecA* geninin yanı sıra diğer antimikrobiyal ajanlara dirençten sorumlu genler, insersiyon dizileri ve fonksiyonları henüz bilinmeyen genler vardır. *SCCmec*'te invertaz/rezolvaz ailesinden *ccrA* ve *ccrB* olarak tanımlanmış iki rekombinaz vardır (83). Son zamanlarda *ccrC* olarak adlandırılan üçüncü bir tip bildirilmiştir. *CcrAB*, tip I-IV *SCCmec* gen kaset yapısında bulunurken, *ccrC* sadece tip V *SCCmec* gen kaset bölgesinde bulunmaktadır (46). *ccr* gen kompleksi *SCCmec*'in hareketinden sorumludur (52). *SCCmec* gen kaset yapısında bulunan ikinci oluşum *SCCmec* komplekstir. Bu yapı IS431*mec*, *mecA* ve düzenleyici genler olan *mecR1* ve *mecI*'nin bütünü veya bir parçasını taşımaktadır. *SCCmec* gen kaset bölgesinin diğer kısımları J (junkyard) bölgesi J1, J2 ve J3 olarak bilinmektedir. Bu bölge özellikle *SCCmec* gen kaset tiplerinin alt tiplendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (46). Günümüze kadar altı *SCCmec* tipi bildirilmiştir (34). *SCCmec* elemanı *mec* gen

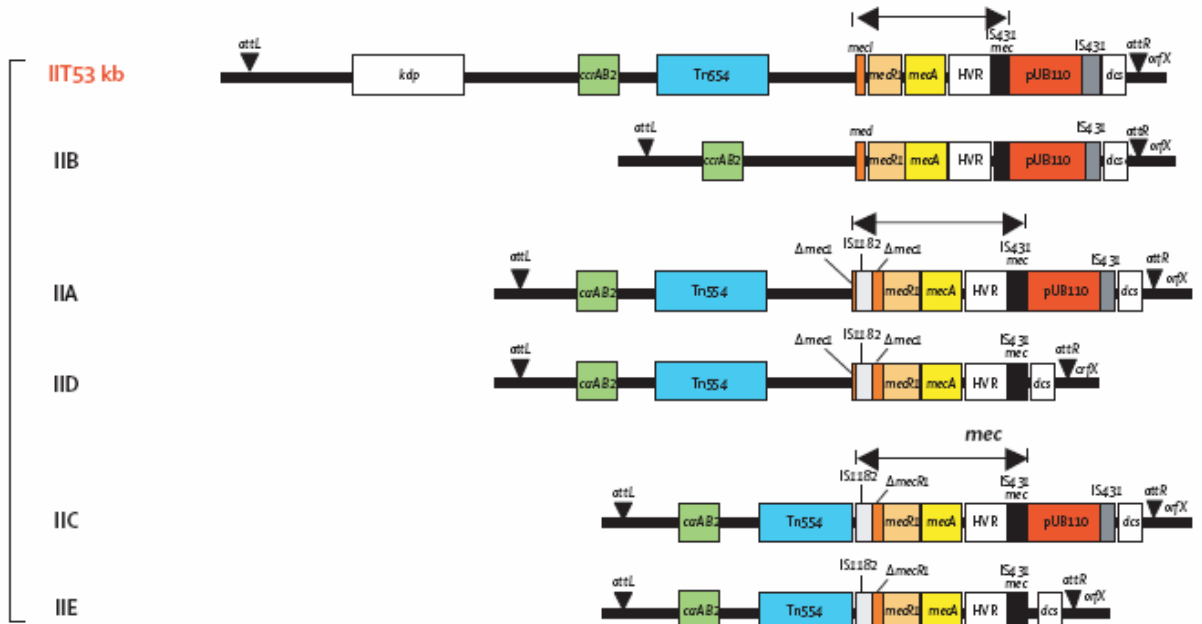
kompleksi ve *ccr* gen kompleksi olmak üzere iki temel genetik bileşimin karakteristik kombinasyonlarını içermektedir (4).

Tip I SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 1 *ccr* gen kompleksi;



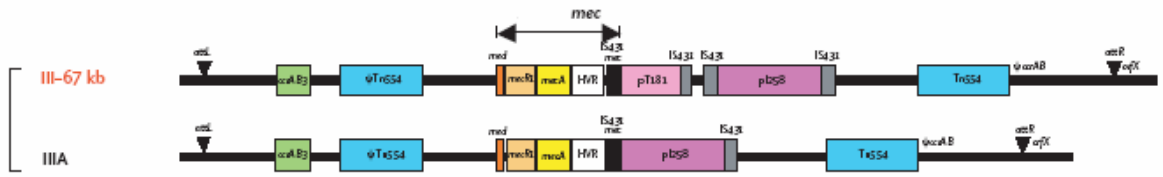
Şekil 1: SCC*mec* tip I (33)

Tip II SCC*mec*, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr* gen kompleksi;



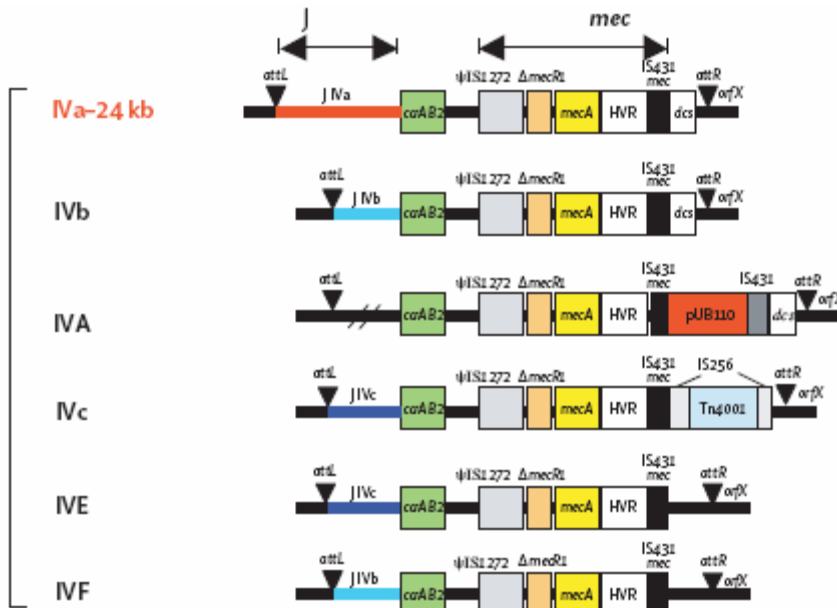
Şekil 2: SCC*mec* tip II (33)

Tip III SCCmec, sınıf A mec gen kompleksi ve tip 3 ccr gen kompleksi;



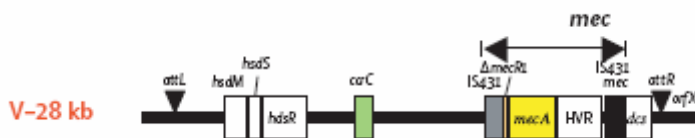
Şekil 3: SCCmec tip III (33)

Tip IV SCCmec, sınıf B mec gen kompleksi ve tip 2 ccr gen kompleksi;



Şekil 4: SCCmec tip IV (33)

Tip V SCCmec, sınıf C2 mec gen kompleksi ve tip 5 ccr gen kompleksi;



Şekil 5: SCCmec tip V (33)

mecA ekspresyonu, baskılayıcı bir gen olan *mecI* ile membranda yer alan ve beta laktam varlığını saptayan bir sinyal iletilici olan *mecR1*'in kontrolü altındadır. Antibiyotiksiz ortamda *mecI*, hem *mecA* hem de *mecR1-mecI*'nin transkripsiyonunu engeller. Beta laktam antibiyotik varlığında ise önce *mecR1* otokatalitik bir süreçle kesilir ve sitoplazmik kısmındaki bir metalloproteaz bölümü aktif hale gelir. Metalloproteaz, *mecA*'nın promoter bölgesine bağlanmış olan *mecI*'yi keser. Böylelikle *mecA* transkripsiyonu ve PBP2a sentezi gerçekleşir. SCC*mec* tip I, IV ve V sadece beta laktam direncini kodlarken, SCC*mec* tip II ve III çoklu dirence yol açar. Bunun nedeni tip II ve III elemanların kaset içine entegre olmuş plazmidler (pUB110, p1258 ve pT181) ile bir transpozon (Tn 554) aracılığıyla ek direnç genleri taşımalarıdır. Plazmid pUB110; kanamisin, tobramisin, bleomisin direncinden sorumlu *ant(4')* genini; p1258; penisilin ve ağır metal direncini, pT181; tetrasiklin direncini taşıırken, Tn554 ise indüklenabilir MLS_B tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır (34).

2.3. PANTON VALENTİN LÖKOSİDİN

Lökositleri lizis yeteneğinden dolayı lökosidin maddesi adıyla 1894 yılında Van de Velde tarafından tanımlanmıştır. Panton ve Valentine 1932 yılında ilk kez deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla lökotoksin arasındaki ilişkiyi bulmuştur (9,72). Finck-Barbancon ve ark. tarafından kronik fronküllü hastadan izole edilen *S. aureus* suş V8'den saflaştırılmıştır. Prevost ve ark. tarafından 1995 yılında toksin geni klonlanıp sekanslanmıştır (67). PVL profaja yerleşen ve lökosit yıkımıyla doku nekrozuna neden olan *lukS-PV* ve *lukF-PV* (*lukS/F-PV*) denilen, birlikte aktarılan genlerce kodlanan iki yapılı bir lökosidindir (57). Katyon değişim kromatografisindeki ayrışma profillerine göre S (yavaş ayrışan-"slow eluted") ve F (hızlı ayrışan-"fast eluted") olarak adlandırılmıştır (67). PVL geni ϕ SLT (stafilokokal lökositolitik toksin), ϕ PVL, ϕ SA2MW ya da ϕ SA2usa fajları üzerinde taşınmaktadır (19, 55, 58, 64).

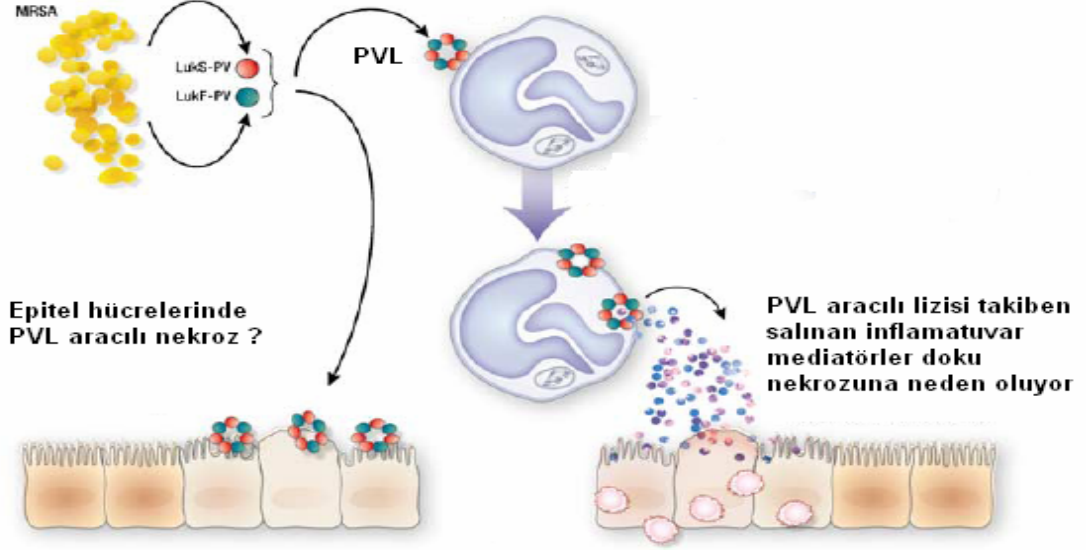
PVL ve gama hemolizin toksin ailesi, iki proteinin sinerjik hareketinden ve por oluşturucu özelliğinden dolayı sinerjohimenotropik toksinler olarak adlandırılmışlardır (74). Bu toksinler S ve F olarak belirtilen sekretuar proteinlerin sinerjistik hareketiyle konak savunma hücrelerinin ve eritrositlerin membranlarında hasara yol açmaktadırlar. Gama hemolizin *S. aureus* klinik izolatlarının %99'undan fazlasında üretilmekte ve aktivitesini üç proteiniyle sağlamaktadır. Bu proteinler, S sınıfına ait hemolizin γ A (HlgA) ve hemolizin γ C (HlgC), F sınıfına ait hemolizin γ B (HlgB) diye

adlandırılmaktadırlar. HlgA+HlgB ve HlgC+HlgB şeklinde ikili çiftler (S+F) oluşturmaktadırlar. Gama hemolizin ile PVL'nin sınıf S ve F proteinleri; HlgA+ HlgB, HlgC+HlgB, lukS-PV+HlgB, HlgA+lukF-PV, HlgC+lukF-PV ve lukS-PV+lukF-PV olmak üzere biyolojik olarak aktif 6 (S+F) çift oluşturabilirler. Gama hemolizini oluşturan HlgA+HlgB ve HlgC+HlgB lökotosik özelliklere sahip olmasının yanısıra tavşan, koyun ve insan eritrositlerini de parçalayabilirken, saflaştırılmış PVL; tavşan ve insan PMNL ile makrofajlar için por indüksiyonuyla sadece lökotosik etki göstermektedir (32,41,53,73).

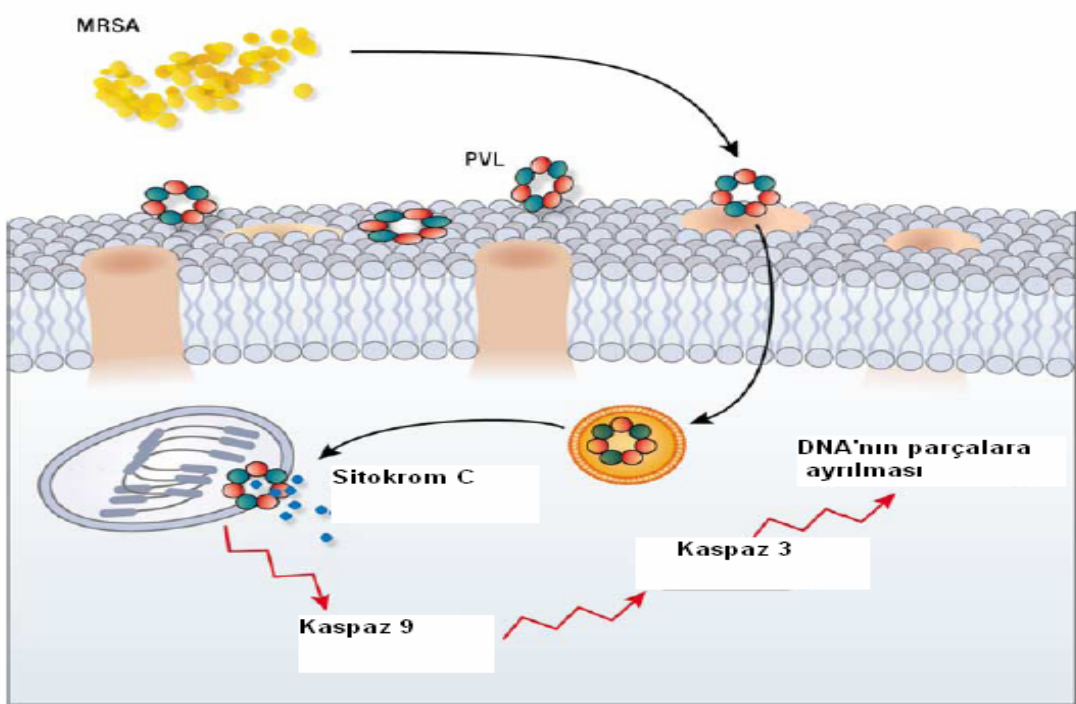
Derin deri ve yumuşak doku infeksiyonları, kısmen fronkül, kutanöz abse ve ciddi nekrotizan pnömoniden elde edilen lökosal toksinler üreten stafilocokların sık elde edilmesi PVL'nin patojenitede önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (59). PVL-pozitif infeksiyonların klinik sekeli PVL-negatif *S. aureus*'dan daha ciddi olma eğilimindedir. PVL-pozitif *S. aureus* ile ilişkili pnömonide sepsis, yüksek ateş, lökopeni, hemoptizi, plevral efüzyon ve ölüm daha sık görülmektedir. Tersine asemptomatik nazal kolonizasyonlu TK-MRSA izolatlarında PVL daha az sıklıkta bulunmaktadır (9).

PMNL lizisine yol açan PVL'nin iki yapısal komponenti LukS-PV ve LukF-PV, PMNL membranında por oluşturucu heptamer için bir araya gelmeden önce salınılmaktadırlar. LukS-PV, LukF-PV ile dimerize olacakları PMNL üstünde bilinmeyen bir reseptöre bağlanmaktadır. Heptamer yapısı oluşuncaya kadar birbiri ardına LukS-PV ve LukF-PV'nin seri bağlanması gerçekleşmektedir. LukS-PV PMNL'ye bağlandığında konak protein kinaz A ya da C, LukS-PV'yi fosforilize ettiğinde kalsiyum iyon kanalları indüklenmektedir. Transdüksiyon sinyal indüksiyonunun interlökinlerin ve inflamatuvar mediatörlerin üretimini tetikleyebileceği düşünülmektedir (9). PMNL'lerden lökotrien B4 ve interlökin 8 salınımına yol açabilmektedir (74). PVL, konsantrasyona bağlı olarak PMNL'lerde lizise ya da apoptozise yol açabilmektedir. Düşük PVL konsantrasyonlarında (5 nanomolar) mitokondrial membran üzerindeki PVL aracılı por oluşumu, sitokrom C salınımına yol açmaktadır. Bunun sonucunda kaspaz 9 ve 3 indüklenmekte ve DNA kırılmaları gerçekleşmektedir. PVL direkt doku nekrozu yapmamaktadır. Yüksek PVL konsantrasyonlarında (200 nanomolar) lizise uğrayan PMNL'lerden reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmakta ve bunun sonucunda da doku nekrozu gerçekleşmektedir. PVL'nin PMNL sitolitik aktivitesiyle uyumlu olarak

PVL pozitif *S. aureus* nekrotizan pnömonisinde nötropeni sık gözlenen bir klinik bulgudur. Bunun nedeninin PVL'nin akciğer endotel hücrelerindeki varlığına bağlı olabileceği düşünülmektedir (1, 9, 28, 87).



Şekil 6: PVL doku nekroz modeli (9)



Şekil 7: PVL'nin indüklediği PMNL apoptozisi (9)

Saflaştırılmış PVL intradermal olarak tavşanlara enjekte edildiğinde; kapiller dilatasyon, kemotaksis, PMNL infiltrasyonu, PMNL karyoreksizi ve deri nekrozuna yol açarak ağır inflamatuvar lezyonlara neden olmaktadır (53). Potent dermonekrotik toksin etkisi fareler üzerinde yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (86). Badiou ve ark. (2) *S. aureus* ile deri infeksiyonlu hastaların püü örneklerinden PVL varlığını saptamak amacıyla ELISA yöntemi uygulamışlardır. Oishi ve ark. (67) toksin üreten izolatların hızlı tanımlanması amacıyla %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan lateks aglütinasyon testini geliştirmişlerdir. Guinti ve ark. (89) %100 duyarlılık ve özgüllükte sinyal yükseltici sandviç hibridizasyon testini geliştirmişlerdir. *In vitro* olarak intravenöz immunglobulin kullanımının *S. aureus*'un ürettiği PVL'yi nötralize ettiğine yönelik çalışmalar vardır (27).

2.4. TK-MRSA ile HK-MRSA İnfeksiyonlarının Karşılaştırılması

Geçmişte MRSA'ların sadece hastane infeksiyonlarından sorumlu olduğu düşünölmekteyken, bu organizmaların son yıllarda ortaya çıkan toplum kaynaklı stafilokok infeksiyonlarının önemli bir nedeni olduğu saptanmıştır. Genomik ve antibiyogram farklılıklarının yanı sıra TK-MRSA izolatlarının hemen hemen hepsi PVL virulans genleri taşımaktadırlar. HK-MRSA'lar yaygın olarak tip I, II, III gibi daha büyük, 34-67 kb uzunluğunda SCCmec kaset gen tipleri taşımaktadırlar. TK-MRSA'lar ise diğer *S. aureus* izolatlarına daha kolay transfer edilebilen ve *mecA* genine sahip yeni, küçük, hareketli bir SCCmec tip IV ya da tip V genetik elemanını taşımaktadırlar (46, 57). SCCmec tip II ve III'ün daha büyük boyutta olması beta laktam dışı antibiyotik direnç genlerini de içerdiğini göstermektedir. SCCmec tip IV'ün *S. aureus*'da ilk kez 1980'lerde gösterilmesinden önce 1970'lerde komensal *S. epidermidis*'de bulunması; SCCmec tip IV'ün 1980'lerde *S. epidermidis*'den transfer edildiğini işaret etmektedir (9).

1980'lere kadar TK-MRSA infeksiyonları daha önceki hastanede yatış öyküsü, hastanede yatan bir hastayla yakın temas ve benzer durumlarla ilişkilendirilmiştir. 1980 ve 1981'de Detroit'ten bildirilen TK-MRSA infeksiyon olguları direkt sağlık hizmetleri maruziyetinden bağımsız, toplumda yayılabilen MRSA'nın ilk anlamlı kanıtı olmuştur. Etkilenen hastaların çoğunun intravenöz uyuşturucu kullanıcıları olduğu ve iğnelerin paylaşılmasının yayılımdaki en önemli yol olduğu belirlenmiştir (60). Daha önceki

antimikrobiyal kullanımının salgın izolatıyla infeksiyon için önemli bir risk faktörü olduğu ortaya çıkmıştır. 1981 ve 1995 yılları arasında ABD'den 12 ve diğer ülkelerden 5 TK-MRSA tanımlanmıştır (29). Batı Avustralya'dan da 1993 yılında daha önceden sağlık hizmetleriyle hiç karşılaşmamış yerlilerden izole edilen yeni MRSA izolatları tanımlanmıştır (33). TK-MRSA ilk kez 1997-1999 yılları arasında Minnesota ve North Dakota'da daha önceden sağlıklı dört çocuğun ölümüne yol açan organizma olarak dikkati çektikten sonra virulan patojenler arasına dahil edilmiştir (25, 63).

TK-MRSA daha çok genç hasta popülasyonunu etkiler, poliklonaldır ve baskın epidemik klon USA300 ya da USA400 olarak sınıflandırılmıştır (40, 84). Bu iki klonal soy özellikle ABD'de toplum kaynaklı izolatlar arasında çok yaygındır ve ST1 (USA400) ve ST8 (USA 300) olarak da adlandırılmaktadır. Öyle ki bazı bölgelerde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından en sık bu izolatlar elde edilmektedir (18, 34, 78). USA 300 izolatlarının bazıları PVL pozitif olmakla birlikte metisiline duyarlıdır (30). Dünya genelinde ST80 (Fransa-İsviçre), ST30 (Southwest Pacific klonu) ve ST93 (Avustralya Queensland klonu) gibi başka yaygın TK-MRSA izolatları da bulunmaktadır (30).

TK-MRSA küçük çocuklar, Avustralya aborjinleri, Amerikan yerlileri, Alaska yerli halkı (60), Pasifik adalılar (60), mahkumlar ve atletler gibi popülasyonları etkileyerek küçük salgınlar oluşturabilmekte ve infeksiyonlara yol açabilmektedir (29). HIV pozitif bireyler genel popülasyona göre 18 kat daha fazla TK-MRSA ile enfekte olabilmektedir (25).

Tablo I: TK-MRSA risk grupları (25, 48, 60)

2 yaşın altındaki çocuklar
Atletler
İntravenöz ya da intranazal ilaç kullanıcıları
Erkeklerle seks yapan erkekler
Askeri personel
Mahkumlar ve akıl hastanesinde yatan hastalar
Veteriner hekimler, evcil hayvan sahipleri, domuz yetiştiricileri
Kolonizasyon öyküsü ya da yakında geçirilmiş TK-MRSA
Daha önceki yıllarda antibiyotik kullanımı, (Özellikle kinolonlar ya da makrolidler)
Eş zamanlı deri ve yumuşak doku infeksiyonlu hastalar
Düşük sosyoekonomik durum
Evsizler
Siyah ırk

TK-MRSA'nın neden olduğu hastalık spektrumu toplumdaki MSSA'larınkine benzemektedir. Özellikle fronkül, karbonkül ve abse şeklinde kendini gösteren deri ve yumuşak doku infeksiyonları en sık gözlenen klinik durumlardır. Daha az oranlarda nekrotizan pnömoni, ampiyem, nekrotizan fasiit, osteomyelit gibi daha ağır ve ciddi tablolarla da karşımıza çıkabilmektedir (17, 31). Buna ek olarak rutin aşılama esnasında kazanılmış TK-MRSA'nın etken olduğu salgın da bildirilmiştir (80).

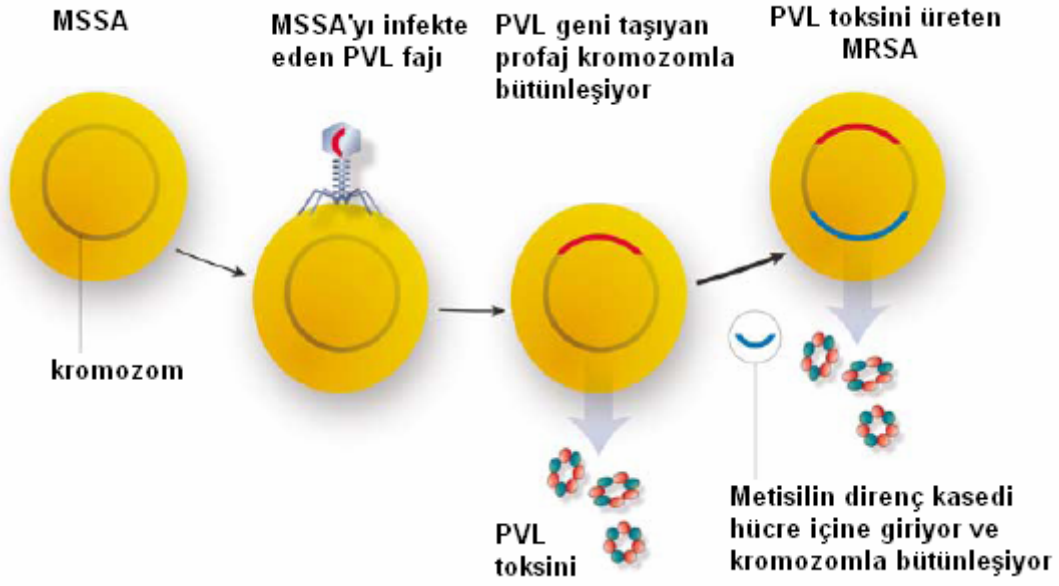
MRSA infeksiyonları için risk faktörleri daha önceki hastaneye yatış, cerrahi müdahale, uzun süre bakım evinde kalma, diyaliz, perkutan tıbbi cihaz ve katater kullanımı olarak sıralanabilir. TK-MRSA tanımı için hastaneye kabulden sonra 48 saat içinde üremenin olması, ayrıca kabulden önceki bir yıl hastanede yatış ve bakım evi öyküsünün olmaması gerekmektedir (48, 85). Tablo II'de "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC)'nin HK-MRSA ile TK-MRSA ayırım kriterleri görülmektedir (60). Tablo II'deki kriterlerin hepsini taşıyan MRSA infeksiyonlu kişiler olası TK-MRSA infeksiyonuna sahiptirler.

Tablo II: CDC kriterleri

MRSA tanısının ayaktan ya da hastaneye kabulden sonraki ilk 48 saat içinde konulması
MRSA infeksiyon ya da kolonizasyon tıbbi öyküsünün olmaması
Kabulden önceki bir yıl hastanede yatış öyküsünün olmaması
Kabulden önceki bir yıl bakım evine kabul öyküsünün olmaması
Kabulden önceki bir yıl diyaliz öyküsünün olmaması
Kabulden önceki bir yıl cerrahi öyküsünün olmaması
Kabulden önceki bir yıl deriyi geçip vücuda uygulanan kalıcı katater ya da tıbbi alet öyküsünün olmaması

Metisiline direnç oranlarındaki artış önceleri yavaş seyrederken, 1990'ların sonlarına doğru gelindiğinde bu oranlarda dramatik bir artış görülmüştür. Bu artış TK-MRSA'ların görülmeye başlanmasıyla aynı zamana denk gelmiştir. Birçok bölgede TK-MRSA izolatları MSSA'dan daha yaygın olmaya başlamıştır (9).

TK-MRSA'ların orjinlerini açıklamak için kabul edilen güncel model; farklı coğrafi bölgelerde dolaşan bir çok farklı MSSA klonunun genomuna küçük metisilin direnç kasedinin (örneğin *SCCmec* tip IV) bağımsız olarak entegre olmasıdır. PVL pozitif TK-MRSA'nın ortaya çıkışıyla ilgili modelde ilk olarak, PVL'yi kodlayan lukS-PV ve lukF-PV taşıyan faj MSSA'yı infekte ve lizojenize etmektedir. Daha sonra *mecA* geni taşıyan metisilin direnç kasedi (*SCCmec* IV, V) horizontal olarak PVL-pozitif MSSA izolatlarına transfer olarak fajın entegre olduğu alandan farklı bir lokalizasyonda genoma entegre olmaktadır (8, 9, 76).



Şekil 8: PVL üreten TK-MRSA'ların ortaya çıkış modeli (9)

TK-MRSA'larda gözlenen artmış virulansın temeli tam olarak anlaşılamamıştır. Bu duruma sebep olarak artmış uyum, konak immün sisteminden kaçınma ve benzersiz toksin üretimi gibi bir takım faktörlerin üzerinde durulmaktadır (30). PVL gen varlığı hastalığın şiddetinde artışla ilişkili olabilmektedir (6). Tavşanlarda PVL'nin dermonekrozise neden olabilmesi durumu, bakterinin kolaylıkla yayılabileceği ve yakın temasla açık deri lezyonlu hastalardan sağlıklı bireylere bulaşabileceği konusunda PVL'nin, tek başına seçici avantaj sağlayacağı düşüncesini desteklemektedir (9). PVL pozitif *S. aureus* insanlar arasında yakın temasla yayılarak özellikle sağlıklı çocuklarda ve erişkinlerde hastalıklara yol açabilmektedir (7). PVL pozitif izolatlar herkeste infeksiyon etkeni olmayabilir. İnfeksiyon gelişmesinde birtakım faktörlerin rolü bulunmaktadır. Kalabalık ortamda bulunma, direkt temas sporları, Amerikan futbolu, güreş sırasında derinin zedelenmiş olması, ortak kullanılan havlular, traş makineleri, kötü el hijyeni ve egzama ile ilişkili olarak derinin zarar görmesi infeksiyon riskini artırmaktadır (37). Asemptomatik sağlıklı taşıyıcıların burunlarından PVL negatif MRSA'nın sık izolasyonu solunum yoluyla yayılımda PVL'ye gereksinim olmadığını göstermektedir. TK-MRSA artışını açıklamada tartışmalı bir hipoteze göre pnömokok aşısının kullanımı sonucu *Streptococcus pneumoniae*'nin nazal kolonizasyonu azalmaktadır. Bu sonuç bir patojenin eliminasyonun diğer patojenler için uygun ortam

sağlamasına yol açmaktadır. Bununla birlikte bu hipotez PVL ile TK-MRSA ilişkisini açıklayamamaktadır (9).

PVL ve SCC_{mec} tip IV taşıyan MRSA izolatları artan oranlarda hastane kaynaklı infeksiyonlardan rapor edilmektedir. Bu durum PVL pozitif TK-MRSA izolatlarının hastanede uygulanan invaziv işlemler esnasında giriş yolu bulmasına bağlı olabilmektedir (9). Bakım evlerinde yaşayan yaşlı popülasyonun sık hastaneye yatış ihtiyacı, TK-MRSA'nın hastane ortamına girişinde bir rol oynayabilmektedir (79). TK-MRSA'nın postpartum kadınlarda ve yenidoğanlarda hastane kaynaklı infeksiyonun etkeni olarak hastane ortamına geçişi durumu daha da karmaşık hale getirmektedir (25, 77).

Linde ve ark. (54)'nin çalışmasında, Güneydoğu Almanya'da hastaneleri, bakım evlerini, diyaliz merkezlerini de kapsayan 10 sağlık kuruluşunda ve bir yenidoğan bakım ünitesinde ortaya çıkan iki ayrı salgının incelenmesi sonucu, potansiyel PVL pozitif MRSA'nın sağlık kuruluşlarına yayılımında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir.

HK-MRSA ve TK-MRSA arasındaki sınırlar, hastanelerle toplum arasında hastaların ve infeksiyonların hareketine bağlı olarak bulanıklaşmaya başlamıştır. Kolonize ya da enfekte hastaların kabulünü takiben TK-MRSA'nın hastane salgınlarına yol açması bu duruma katkıda bulunmaktadır (65). TK-MRSA ile HK-MRSA arasındaki farklılıklar Tablo III'de özetlenmiştir.

Tablo III : TK-MRSA ile HK-MRSA arasındaki farklılıklar (60, 65)

Parametre	HK-MRSA	TK-MRSA
Etkilenen hasta tipi	Yaşlı debilize hastalar Kritik ya da kronik hasta Bakım evi hastaları Preterm yenidoğanlar	Genç sağlıklı kişiler Öğrenciler Profesyonel atletler Askeri personel Etnik gruplar
İnfeksiyon bölgesi	Bakteriyemi Cerrahi yaralar Açık ülserler Kateter idrarı Ventilatör ilişkili pnömoni	Deri ve yumuşak doku infeksiyonu Nekrotizan pnömoni Septik şok Kemik-eklem infeksiyonları
Geçiş	Kişiden kişiye geçiş (hastane personeli, ziyaretçiler, hastalar arasında) Çevreden hastaya yayılım (hastane ekipmanlarıyla)	Kişiden kişiye geçiş (Aile ya da spor takımları içinde)
Tanıdaki klinik durum	Yatan hasta	Ayaktan ya da toplum kaynaklı
Tıbbi öykü	MRSA kolonizasyon öyküsü Geçirilmiş infeksiyon Geçirilmiş cerrahi Hastaneye başvuru Bakımevine başvuru Antibiyotik kullanımı Diyaliz, kalıcı katater Perkütan tıbbi cihazlar	Önemli tıbbi öykü ya da sağlık hizmetleri alımı yok Yakın fiziksel temas Açık yaralar Zayıf toplumsal hijyen (havluların paylaşılması)
Virulans	Toplum yayılımı sınırlı PVL geni genellikle yok	Toplumda yayılımı sık Sıklıkla PVL geni var
Antibiyotik duyarlılığı	Sıklıkla çoklu ilaç direnci	Çoğu antibiyotiğe duyarlı

Klinik, epidemiyolojik ve mikrobiyolojik özellikler temel alınarak ve literatürdeki ortak görüş doğrultusunda Millar ve ark. (60) tarafından belirtilen TK-MRSA'ların alt tanımlamaları Tablo IV'de sunulmuştur.

Tablo IV: TK-MRSA özellikleri ve önerilen alt tanımlamalar

(1) İzolat öncelikle MRSA olarak doğrulanmalı (PZR ile pozitif <i>mecA</i> geni ya da lateks aglütinasyonla PBP2a pozitifliği, koagülaz pozitif)
(2) Epidemiyolojik geçmiş CDC rehberleri doğrultusunda MRSA'lı hastaların toplumdan kaynaklanması MRSA geçişi için risk faktörleri olmamalı
(3) Antibiyotik duyarlılığı İzolat sıklıkla beta laktam ajanlara dirençli fakat diğer sınıf antibiyotiklere HK-MRSA ile karşılaştırıldığında göreceli olarak duyarlı
(4) Klinik durum Olguların çoğu deri ve yumuşak doku infeksiyonlu hastalar
(5) SCC <i>mec</i> tipi Baskın tip IV ya da V
PVL ⁺ TK-MRSA: yukarıda sıralanan özelliklerin hepsinin bulunması ve <i>pvl</i> gen pozitifliği
PVL ⁻ TK-MRSA: yukarıda sıralanan özelliklerin hepsinin bulunması ve <i>pvl</i> gen negatifliği
Nozokomiyal TK-MRSA: yukarıda sıralanan özelliklerden (1), (3) ve (5) mevcut, PVL geni pozitif ya da negatif olabilir

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na, Şubat 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA'lardan belirli periyotlarda seçilen 130 MRSA ve 20 MSSA olmak üzere toplam 150 *S. aureus* izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatların metisilin direncinin belirlenmesinde VITEK2 Compact otomatize sistemi kullanıldı.

3.1 Stafilkokların Tanımlanması

Laboratuvara gelen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve "Eosine-Methylen Blue" agara ekilmiştir. 35°C'de, 18-24 saatlik inkübasyondan sonra kanlı agarda üreyen koloniler koloni morfolojisi, pigment oluşumu, Gram boyama, katalaz ve koagülaz deneylerinin sonucuna göre *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Geleneksel tanımlamanın doğrulanması VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sisteminde ID GP kartları kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın diğer aşamaları için izolatlar saf olarak %15 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -20°C'de saklandı.

3.2 Metisilin Direncinin Belirlenmesi

İzolatların metisilin direnci VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle belirlenmiş ve multipleks PZR'de *mecA* geni tespit edilerek doğrulanmıştır.

3.2.1. VITEK2 Compact Otomatize Sistem

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda AST P536 kartı kullanılarak antibiyotik duyarlılığı belirlendi. Klinik izolatlar %5 koyun kanlı agara pasajlandıktan sonra 16-18 saat 35 °C'de inkübe edildi. Steril eküvyon kullanılarak kanlı agardaki tek düşmüş stafilkok kolonileri alınarak McFarland 0.5-0.6 bulanıklığa ayarlandı. Kartlar ve süspansiyonlar cihaza yerleştirildi. Süspansiyonların kartlara inoküle edilmesi, inkübatöre yerleştirme, okuma, değerlendirme ve kartların çöpe atılma işlemleri cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı.

3.3. Genotipik Yöntemler

3.3.1. *S. aureus* Bakteri Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu

S. aureus bakteri hücrelerinden DNA eldesi fenol-kloroform yöntemine göre yapıldı (21).

- Mueller Hilton Agar (MHA) üzerinde saf kültür halinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak 2 ml steril Tris HCl-EDTA (TE) tamponu bulunan ependorf tüplerine konuldu. 30 saniye vortekslenerek süspansiyon homojen haline getirildi.
- 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilip üst sıvı atıldı. Pellet üzerine 0.2 ml TE tamponu ve 0.2 ml Proteinaz K solüsyonu eklenip dikkatlice karıştırıldı.
- Karışım 50°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- Bu aşamada solüsyon vizkoz olduğundan pipetlemenin rahat yapılabilmesi için solüsyona 2 ml TE tamponu ekleyip iyice karıştırıldı.
- Karışımın 0.4 ml'si 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 0.4 ml fenol konularak karışım vortekslendi ve 11.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 0.4 ml kloroform eklenip vortekslendi ve 11.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine toplanan sıvı hacminin 1/10'u kadar 3M sodyum asetat ve iki katı kadar absölv alkol eklenip karıştırıldı
- Karışım -20°C'de 30-60 dakika soğutuldu.
- 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve üst kısım atıldı.
- DNA pelleti üzerine 1 ml soğuk %70'lik ethanol eklenerek 14.000 g'de santrifüj edildi ve üst kısım atıldı.

DNA pelleti oda ısısında kurutulup üzerine 50 µl TE tamponu eklenerek dikkatlice homojenize edildi ve kullanılmıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

Tablo V: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* primer dizileri (McClure ve ark., 2006)

Primer adı	Primer dizisi
<i>Staphylococcus</i> cins spesifik 16S rRNA'ya özgü primerler	
Staph756F	5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3'
Staph750R	5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3'
<i>lukS/F-PV</i>'ye özgü primerler	
Luk-PV-1	5'- ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A – 3'
Luk-PV-2	5'- GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC – 3'
<i>mecA</i>'ya özgü primerler	
mecA1	5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'
mecA2	5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3'

3.3.3. PZR Optimizasyonu

PZR çalışmalarında kullanılacak uygun DNA, magnezyum miktarı ve primer bağlanma ısılarının tespiti için PZR optimizasyon denemeleri yapıldı.

DNA Optimizasyonu: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin multipleks PZR amplifikasyonu için 2, 5 ve 7µl DNA kullanılarak DNA optimizasyonu yapıldı. Multipleks PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan DNA optimizasyonunda amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmelerinde en iyi bant profili 5 µl DNA kullanılarak elde edildi.

Magnezyum Klorür Optimizasyonu: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin multipleks PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda MgCl₂ kullanılarak yapılan optimizasyon deneyleri Tablo VI'da özetlenmiştir. Magnezyum optimizasyonunda kullanılan reaksiyon karışımının hazırlanmasında McClure ve ark. (57)'nin önerdiği yöntem kullanılmıştır.

Tablo VI: MgCl₂ optimizasyonu

Reaksiyon karışımı (25 µl)	Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6	Tüp 7	Tüp 8	Tüp 9	Tüp 10
Saf su (µl)	4.55	4.05	3.55	3.05	2.55	2.05	1.55	1.05	0.55	0.05
KCl'li 10X PZR tamponu (µl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
25 mM MgCl₂ (µl) (mM)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
2 mM dNTP (µl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
2 pmol Primer 1 (µl)	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875
2 pmol Primer 1 (µl)	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875	0.875
2 pmol Primer 2 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2 pmol Primer 2 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2 pmol Primer 3 (µl)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2 pmol Primer 3 (µl)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5U/µl Taq DNA polimeraz (µl)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Kalıp DNA 50 ng (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Toplam	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Multipleks PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla yapılan MgCl₂ optimizasyonunda amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmelerinde en iyi bant profili 25mM MgCl₂'den 3.0 µl kullanılarak elde edildi.

Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu: Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin primer bağlanma ısılarının belirlenebilmesi amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Yapılan optimizasyon çalışmasında *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için en uygun bağlanma ısı 50-55°C olarak belirlendi.

3.3.4. Multipleks PZR Yöntemiyle *Staphylococcus* Cins Spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* Genlerinin Amplifikasyonu ve Gen Bölgelerinin Saptanması

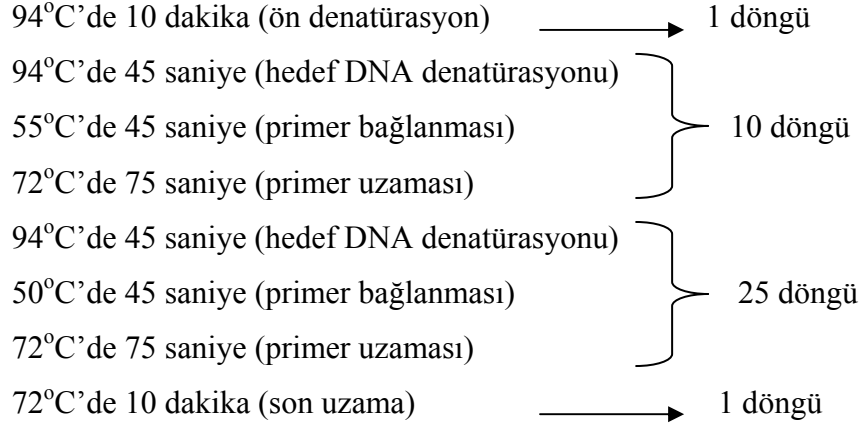
Multipleks PZR aynı tüpe farklı hedefler için özgül olan iki veya daha fazla primerin birlikte konulduğu ve aynı anda çok sayıda hedef dizinin amplifiye edildiği bir amplifikasyon reaksiyonudur. Multipleks reaksiyonda kullanılan primerlerin benzer bağlanma ısılarına sahip olmaları ve dimerizasyondan kaçınmak için birbirlerini tamamlayıcı özellikte olmamalarına mutlaka dikkat edilmelidir (20). *S. aureus* bakteri hücrelerinden elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri eş zamanlı olarak amplifiye edildi.

S. aureus izolatlarında metisilin direncinin belirleyicisi olan *mecA* geninin, iki yapılı protein olan PVL S/F'yi kodlayan *lukS/F-PV* geninin ve internal kontrol olarak kullanılan *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA geninin belirlenebilmesi için sırasıyla *mecA1* ve *mecA2*, Luk-PV-1 ve Luk-PV-2, Staph756F ve Staph750R primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulamada kullanılan PZR karışım reaksiyon içeriği Tablo VII'de gösterilmiştir.

Tablo VII: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli 25 µl PZR reaksiyon karışımı

10X PZR tamponu	2.5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
dNTP karışımı (2 mM)	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2 µl
Staph756F primeri (2 pmol)	0.875 µl
Staph750R primeri (2 pmol)	0.875 µl
Luk-PV-1 primeri (2 pmol)	1 µl
Luk-PV-2 primeri (2 pmol)	1 µl
<i>mecA</i> -1 primeri (2 pmol)	3 µl
<i>mecA</i> -2 primeri (2 pmol)	3 µl
Kalıp DNA (50 ng)	5 µl
Saf su	2.05 µl
Toplam	25 µl

Staphylococcus cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için amplifikasyon programı:



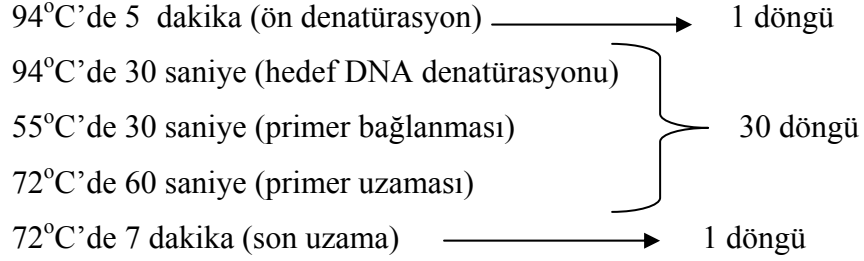
3.3.5. PZR Yöntemiyle (Single-target) *lukS/F-PV* Geninin Amplifikasyonu ve Gen Bölgesinin Saptanması

S. aureus bakteri hücrelerinden fenol-kloroform yöntemiyle elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak PZR yöntemiyle *lukS/F-PV* gen bölgesi amplifiye edildi. *S. aureus* izolatlarında iki yapılı protein olan PVL S/F’yi kodlayan *lukS/F-PV* geninin belirlenebilmesi için Lina ve ark. (53) tarafından tanımlanan 433 bp’lik ürün oluşturan Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulamada kullanılan PZR karışım reaksiyon içeriği Tablo VIII’de gösterilmiştir.

Tablo VIII: *lukS/F-PV* gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli 40.3 µl PZR reaksiyon karışımı

10X PZR tamponu	4 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
dNTP karışımı (1.25 mM)	3 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.3
Luk-PV-1 primeri (5 pmol)	2 µl
Luk-PV-1 primeri (5 pmol)	2 µl
Kalıp DNA (50 ng)	5 µl
Saf su	20 µl
Toplam	40.3 µl

lukS/F-PV gen bölgesi için amplifikasyon programı:



3.3.6 DNA Elektroforezi

PZR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için agaroz konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. 2 saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Elektroforez işlemini takiben örneklere ait DNA bantları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırmalı olarak görüntüleme cihazında incelendi.

4-BULGULAR

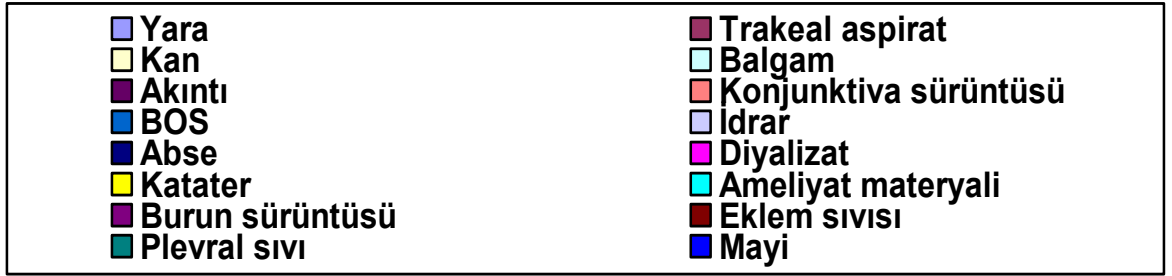
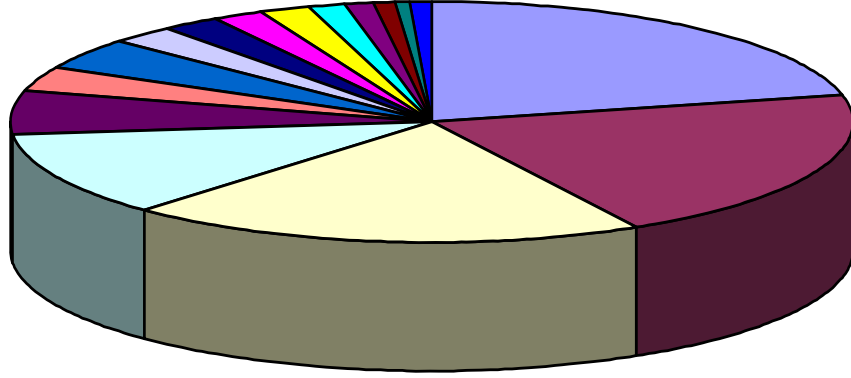
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Altdisiplin Laboratuvarı'na, Şubat 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA'lerden belirli periyotlarda seçilen 130 (% 86.7) MRSA ve 20 (% 13.3) MSSA olmak üzere toplam 150 *S. aureus* izolatu çalışmaya dahil edildi.

Hastanemizde yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından laboratuvarımıza gönderilen materyallerden izole ettiğimiz *S. aureus*'ların materyal dağılımı Tablo IX'da ve Şekil 9'da gösterilmiştir.

Tablo IX: *S. aureus*'ların izole edildiği materyallerin dağılımı

Materyal cinsi	Sayı	%	Materyal cinsi	Sayı	%
Yara	32	21.3	Abse	3	2
Trakeal aspirat	31	20.6	Diyalizat	3	2
Kan	30	20	Katater	3	2
Balgam	17	11.3	Ameliyat materyali	2	1.3
Akıntı	9	6	Burun sürüntüsü	2	1.3
Konjunktiva sürüntüsü	5	3.4	Eklem sıvısı	1	0.7
BOS	6	4	Plevral sıvı	1	0.7
İdrar	4	2.7	Mayi	1	0.7

S. aureus'ların en sık izole edildiği materyal % 21.3 ile yara kültürü olup bunu % 20.6 ile trakeal aspirat kültürü, %18.6 ile kan kültür örnekleri izlemektedir.



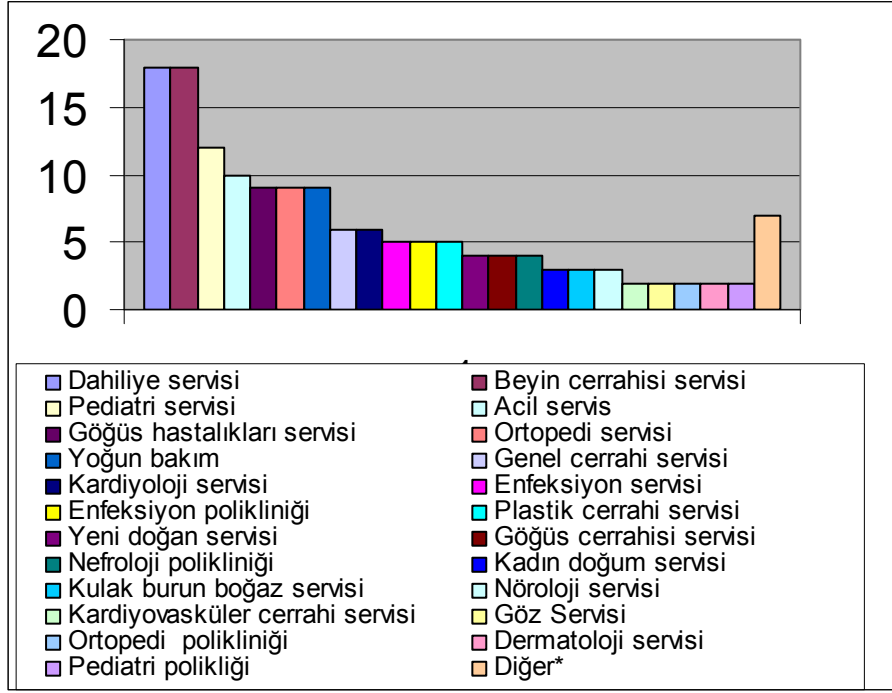
Şekil 9 : Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından gönderilen materyallerin dağılımı

Laboratuvarımıza gelen materyallerin kliniklere göre dağılımı Tablo X’da gösterilmiştir. Laboratuvarımıza materyallerin en büyük bölümü Dahiliye ve Beyin Cerrahisi Servisleri’nden gönderilmiş ve bunu Pediatri Servisi izlemiştir. Gönderilen materyallerin servislere ve polikliniklere göre dağılım grafiği Şekil 10’da sunulmuştur.

Tablo X: Gönderilen materyallerin servislere göre dağılımı

Klinik	Sayı	%
Dahiliye Servisi	18	12
Beyin Cerrahisi Servisi	18	12
Pediyatri Servisi	12	8
Acil Servis	10	6.6
Göğüs Hastalıkları Servisi	9	6
Ortopedi Servisi	9	6
Yoğun Bakım Ünitesi	9	6
Genel Cerrahi Servisi	6	4
Kardiyoloji Servisi	6	4
İnfeksiyon Servisi	5	3.4
İnfeksiyon Polikliniği	5	3.4
Plastik Cerrahi Servisi	5	3.4
Yeni Doğan Servisi	4	2.7
Göğüs Cerrahisi	4	2.7
Nefroloji Polikliniği	4	2.7
Kadın Doğum Servisi	3	2
Kulak Burun Boğaz Servisi	3	2
Nöroloji Servisi	3	2
Kardiyovasküler Cerrahi Servisi	2	1.3
Göz Hastalıkları Servisi	2	1.3
Ortopedi Polikliniği	2	1.3
Dermatoloji Servisi	2	1.3
Pediyatri Polikliniği	2	1.3
Diğer *	7	4.6

*Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği, Göğüs Cerrahisi Polikliniği, Göğüs Hastalıkları Polikliniği, Kadın Doğum Polikliniği, Pediyatrik Yoğun Bakım, Üroloji Servisi ve Koroner Yoğun Bakım



Şekil 10: Gönderilen materyallerin servislere göre dağılım grafiği

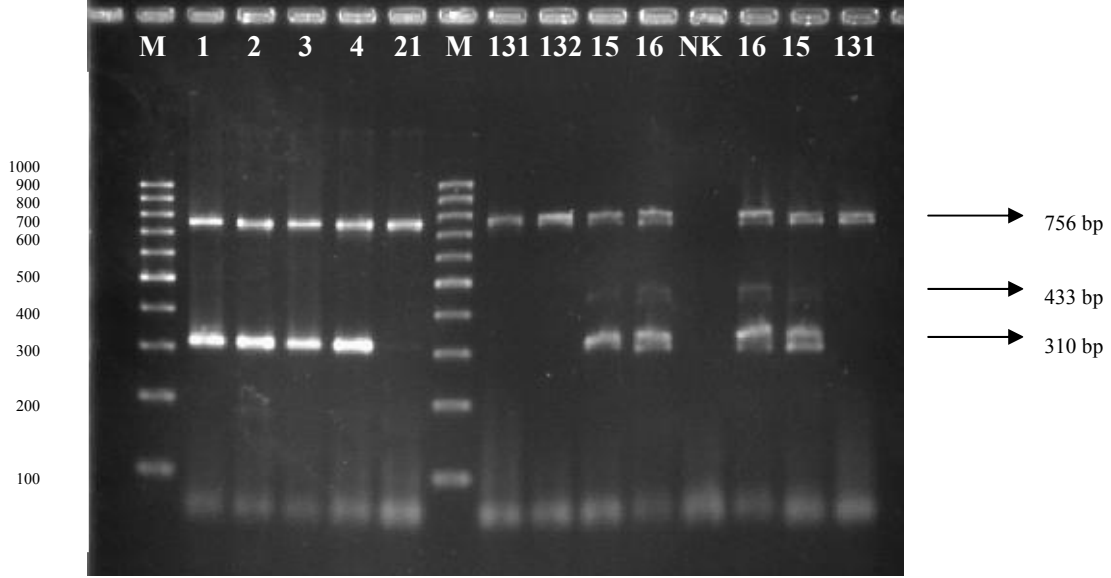
*Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği, Göğüs Cerrahisi Polikliniği, Göğüs Hastalıkları Polikliniği, Kadın Doğum Polikliniği, Pediatrik Yoğun Bakım, Üroloji Servisi ve Koroner Yoğun Bakım

PZR Optimizasyonu

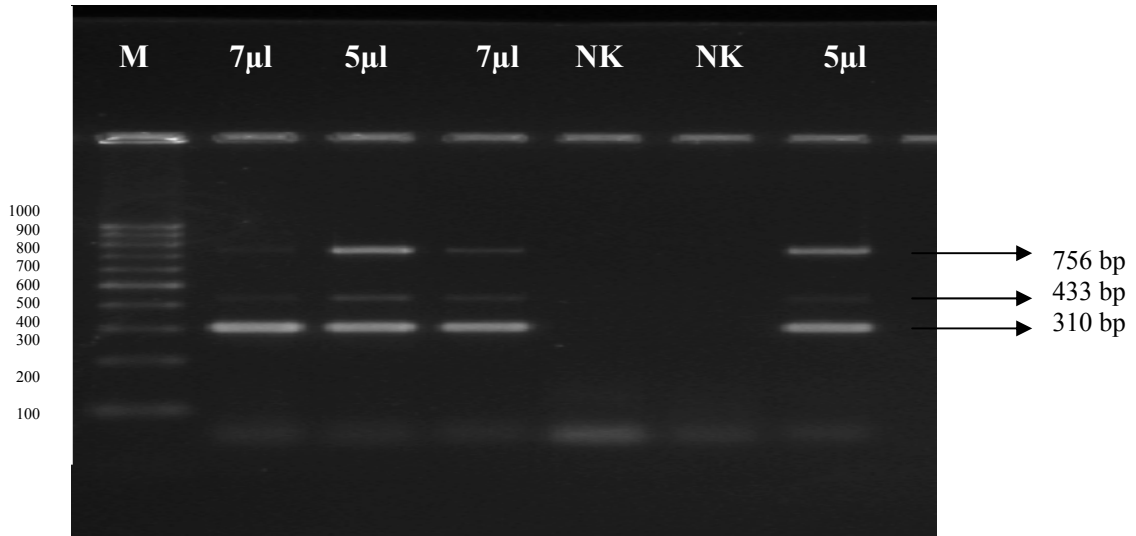
PZR çalışmalarında kullanılacak uygun DNA, magnezyum miktarı ve primer bağlanma ısılarının tespiti için PZR optimizasyon denemeleri yapıldı.

DNA Optimizasyonu: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin multipleks PZR amplifikasyonu için 2 µl DNA kullanılarak elde edilen bant görüntüleri Şekil 11A'da gösterilmiştir.

2 µl DNA kullanıldığında *lukS/F-PV* gen bölgesinin görüntülenmesinde net bant profili elde edilemediği için *lukS/F-PV* gen bölgesini pozitif bulduğumuz 15 ve 16 no'lu izolattan elde ettiğimiz DNA'lardan 5 ve 7 µl kullanılarak DNA optimizasyonu yapıldı. *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin DNA optimizasyon bant görüntüleri Şekil 11B'de gösterilmiştir.

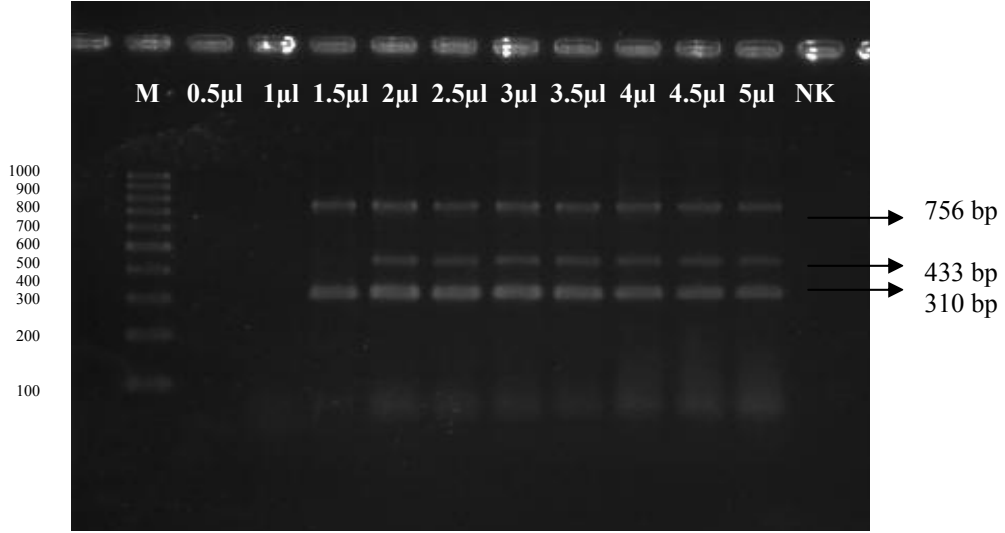


Şekil 11A: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için 2 μ l DNA kullanılarak elde edilen 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri (M: Marker NK: Negatif kontrol)



Şekil 11B: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için DNA optimizasyonu sonucu elde edilen 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri (M: Marker NK: Negatif kontrol)

Magnezyum Klorür Optimizasyonu: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin multipleks PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda MgCl₂ kullanılarak yapılan optimizasyon deneylerinin bant görüntüleri Şekil 12’te gösterilmiştir.

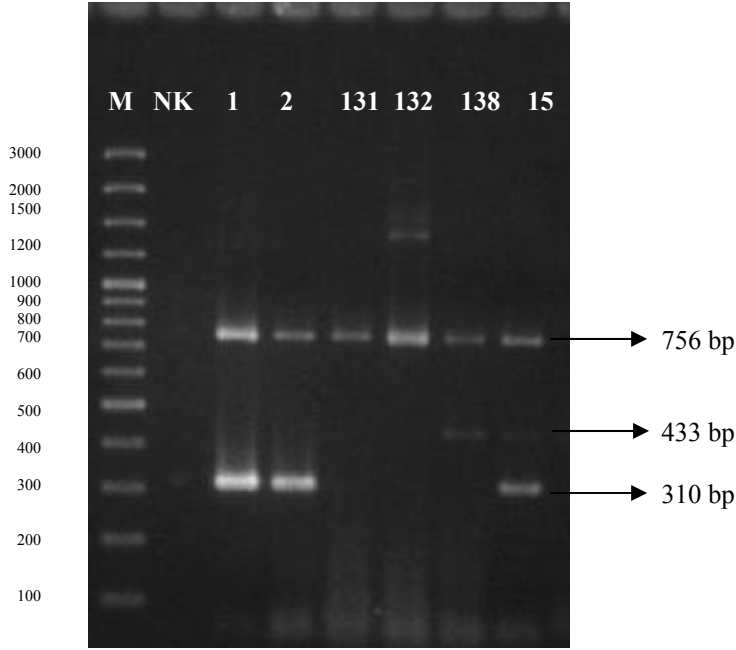


Şekil 12: *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için MgCl₂ optimizasyonu ile oluşan 756, 433, 310 bp’lik bant profilleri (M: Marker NK: Negatif kontrol).

Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu: Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgelerinin primer bağlanma ısılarının belirlenebilmesi amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı ve en uygun bağlanma ısı 50-55°C olarak belirlendi.

Multipleks PZR Yöntemiyle *Staphylococcus* Cins Spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* Genlerinin Amplifikasyonu ve Gen Bölgelerinin Saptanması

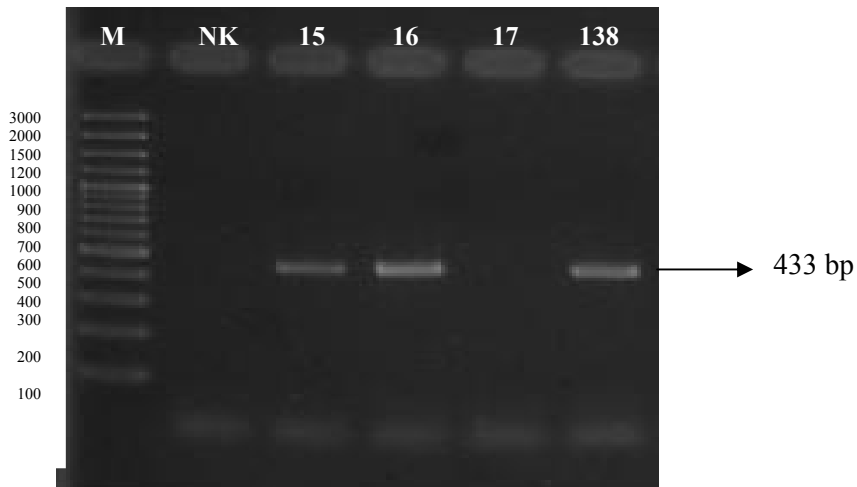
MecA1 ve MecA2, Luk-PV-1 ve Luk-PV-2, Staph756F ve Staph750R primerleri kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle *S. aureus* izolatlarında *mecA* geniyle birlikte *lukS/F-PV* geninin varlığı araştırıldı. 150 adet *S. aureus* izolatu arasında *mecA* geni (310 bp) bulunma oranı %86.6 olarak tespit edilirken *lukS/F-PV* geni (433 bp) bulunma oranı %2 olarak tespit edildi.



Şekil 13: PVL (+) ve PVL (-) MRSA-MSSA izolatlarının 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri

PZR Yöntemiyle (single-target) *lukS/F-PV* Geninin Amplifikasyonu ve Gen Bölgesinin Saptanması

Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle *S. aureus* izolatlarında *lukS/F-PV* geninin varlığı araştırıldı. 150 adet *S. aureus* izolatu arasında *lukS/F-PV* geni (433 bp) bulunma oranı % 2 olarak tespit edildi. PVL geni pozitif *S. aureus* izolatlarının bant görüntüleri Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: *S. aureus* izolatlarında saptanan 433 bp'lik *lukS/F-PV* gen bölgeleri (M: Marker NK: Negatif kontrol)

Çalışmamızda 150 *S. aureus* izolatının 3 (%2) tanesinde *lukS/F-PV* geni tespit edilmiştir. *lukS/F-PV* geni pozitif olan izolatlardan 2'sinin MRSA, 1'inin ise MSSA'ya ait olduğu belirlenmiştir. Tablo XI'de MRSA izolatlarının, Tablo XII'de ise MSSA izolatlarının 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* genlerinin PZR sonuçları gösterilmiştir.

Tablo XI: MRSA izolatlarının 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* genlerinin PZR sonuçları

No	İzolat	16S rRNA	<i>lukS/F-PV</i>	<i>mecA</i>	No	İzolat	16S rRNA	<i>lukS/F-PV</i>	<i>mecA</i>
1	MRSA	+	-	+	66	MRSA	+	-	+
2	MRSA	+	-	+	67	MRSA	+	-	+
3	MRSA	+	-	+	68	MRSA	+	-	+
4	MRSA	+	-	+	69	MRSA	+	-	+
5	MRSA	+	-	+	70	MRSA	+	-	+
6	MRSA	+	-	+	71	MRSA	+	-	+
7	MRSA	+	-	+	72	MRSA	+	-	+
8	MRSA	+	-	+	73	MRSA	+	-	+
9	MRSA	+	-	+	74	MRSA	+	-	+
10	MRSA	+	-	+	75	MRSA	+	-	+
11	MRSA	+	-	+	76	MRSA	+	-	+
12	MRSA	+	-	+	77	MRSA	+	-	+
13	MRSA	+	-	+	78	MRSA	+	-	+
14	MRSA	+	-	+	79	MRSA	+	-	+
15	MRSA	+	+	+	80	MRSA	+	-	+
16	MRSA	+	+	+	81	MRSA	+	-	+
17	MRSA	+	-	+	82	MRSA	+	-	+
18	MRSA	+	-	+	83	MRSA	+	-	+
19	MRSA	+	-	+	84	MRSA	+	-	+
20	MRSA	+	-	+	85	MRSA	+	-	+
21	MRSA	+	-	+	86	MRSA	+	-	+
22	MRSA	+	-	+	87	MRSA	+	-	+
23	MRSA	+	-	+	88	MRSA	+	-	+
24	MRSA	+	-	+	89	MRSA	+	-	+
25	MRSA	+	-	+	90	MRSA	+	-	+
26	MRSA	+	-	+	91	MRSA	+	-	+
27	MRSA	+	-	+	92	MRSA	+	-	+
28	MRSA	+	-	+	93	MRSA	+	-	+
29	MRSA	+	-	+	94	MRSA	+	-	+

30	MRSA	+	-	+	95	MRSA	+	-	+
31	MRSA	+	-	+	96	MRSA	+	-	+
32	MRSA	+	-	+	97	MRSA	+	-	+
33	MRSA	+	-	+	98	MRSA	+	-	+
34	MRSA	+	-	+	99	MRSA	+	-	+
35	MRSA	+	-	+	100	MRSA	+	-	+
36	MRSA	+	-	+	101	MRSA	+	-	+
37	MRSA	+	-	+	102	MRSA	+	-	+
38	MRSA	+	-	+	103	MRSA	+	-	+
39	MRSA	+	-	+	104	MRSA	+	-	+
40	MRSA	+	-	+	105	MRSA	+	-	+
41	MRSA	+	-	+	106	MRSA	+	-	+
42	MRSA	+	-	+	107	MRSA	+	-	+
43	MRSA	+	-	+	108	MRSA	+	-	+
44	MRSA	+	-	+	109	MRSA	+	-	+
45	MRSA	+	-	+	110	MRSA	+	-	+
46	MRSA	+	-	+	111	MRSA	+	-	+
47	MRSA	+	-	+	112	MRSA	+	-	+
48	MRSA	+	-	+	113	MRSA	+	-	+
49	MRSA	+	-	+	114	MRSA	+	-	+
50	MRSA	+	-	+	115	MRSA	+	-	+
51	MRSA	+	-	+	116	MRSA	+	-	+
52	MRSA	+	-	+	117	MRSA	+	-	+
53	MRSA	+	-	+	118	MRSA	+	-	+
54	MRSA	+	-	+	119	MRSA	+	-	+
55	MRSA	+	-	+	120	MRSA	+	-	+
56	MRSA	+	-	+	121	MRSA	+	-	+
57	MRSA	+	-	+	122	MRSA	+	-	+
58	MRSA	+	-	+	123	MRSA	+	-	+
59	MRSA	+	-	+	124	MRSA	+	-	+
60	MRSA	+	-	+	125	MRSA	+	-	+
61	MRSA	+	-	+	126	MRSA	+	-	+
62	MRSA	+	-	+	127	MRSA	+	-	+
63	MRSA	+	-	+	128	MRSA	+	-	+
64	MRSA	+	-	+	129	MRSA	+	-	+
65	MRSA	+	-	+	130	MRSA	+	-	+

Tablo XII: MSSA izolatlarının 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* genlerinin PZR sonuçları

No	İzolat	16S rRNA	<i>lukS/F-PV</i>	<i>mecA</i>	No	İzolat	16S rRNA	<i>lukS/F-PV</i>	<i>mecA</i>
131	MSSA	+	-	-	141	MSSA	+	-	-
132	MSSA	+	-	-	142	MSSA	+	-	-
133	MSSA	+	-	-	143	MSSA	+	-	-
134	MSSA	+	-	-	144	MSSA	+	-	-
135	MSSA	+	-	-	145	MSSA	+	-	-
136	MSSA	+	-	-	146	MSSA	+	-	-
137	MSSA	+	-	-	147	MSSA	+	-	-
138	MSSA	+	+	-	148	MSSA	+	-	-
139	MSSA	+	-	-	149	MSSA	+	-	-
140	MSSA	+	-	-	150	MSSA	+	-	-

MRSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatların elde edildiği örneklerden 1'i Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan örneği, diğeri ise Plastik Cerrahi Servisi'nden gönderilen yara örneğidir. MSSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatın elde edildiği materyal Kardiyoloji Servisi'nden gönderilen idrar örneğidir. PVL pozitif izolatların 3'ü de tetrasikline dirençli bulunmuştur. MRSA izolatları arasında PVL geni saptanan Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan izolatu tetrasiklinin yanı sıra gentamisine ve siprofloksasine de dirençli bulunmuştur.

6-TARTIŞMA

Mısır mumyalarındaki osteomyelitik lezyonlar, Ortaçağ dönemindeki askerlerdeki yara infeksiyonları ve günümüzdeki yenidoğan ünitelerindeki sepsis salgınları *S. aureus*'un tıp tarihi kadar eski ve hayatın her evresinde invaziv hastalık yapabilme kapasitesine sahip son derece başarılı bir patojen olduğu gerçeğini göstermektedir. Sahip olduğu bir dizi adhezinler, ekzotoksinler ve diğer virulans faktörleri hiç şüphesiz başarısının sebebini açıklamaktadır (29).

MRSA'lara bağlı endokardit, pnömoni ve bakteriyemi gibi ciddi infeksiyonlar hastanelerde daha yaygın görülmektedir. Belki daha da önemlisi MRSA infeksiyonlarının günümüzde daha önceden sağlıklı ve hastaneden geçişin olmadığı bireyler arasında da yerini almaya başlamış olmasıdır. Böylelikle çocuklar, adölesanlar, atletler gibi birçok farklı topluluklarda bulunan, sıklıkla deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla kendini gösteren MRSA infeksiyonları toplum kaynaklı diye isimlendirilmiştir. HK-MRSA izolatlarıyla karşılaştırıldıklarında TK-MRSA izolatları ayırt edici genetik profile sahiptir (43).

HK-MRSA oranları bazı Avrupa ülkelerinde azalmaktadır. TK-MRSA'lar ise prevelansları ve moleküler epidemiyolojileri kıtadan kıtaya oldukça değişkenlik göstermekle beraber dünyanın birçok bölgesinde hızla yayılmaktadır (66).

TK-MRSA izolatları ile HK-MRSA izolatları arasında bir takım farklar bulunmaktadır. Toplum kaynaklı izolatların en önemli özelliklerinden birisi PVL adı verilen toksin içermeleridir. PVL hem MRSA hem de MSSA izolatlarında bulunabilmektedir (37).

Yakın zamana kadar PVL kodlayan genlerle sık karşılaşılıyordu ve dünya çapında *S. aureus*'larda oran %5'in altındaydı. Bununla birlikte yeni ortaya çıkan TK-MRSA izolatlarında çeşitli çalışmalarda %77-100 gibi görülme oranları rapor edilmektedir (57). Günümüzde PVL pozitif TK-MRSA infeksiyonları birçok kentsel bölgede endemik olarak görülmekte ve ABD, Avustralya ile Avrupa'nın birçok ülkesinde TK-MRSA infeksiyonlarının çoğuna neden olmaktadır (12).

S. aureus'da PVL varlığı hastalık şiddetinde artışla birlikte cerrahi direnaja ihtiyaç gösteren deri infeksiyonundan, ağır kronik osteomyelite ve ölümcül nekrotizan pnömoniye kadar değişen olgularla ilişkilidir. Belki de ileride PVL virulans faktörünün görüntülenmesi gelecekte rutin laboratuvar işlemleri arasına girecektir (57).

PVL'nin saptanmasında önceleri tavşan antikoru ile yapılan immüno-difüzyon ya da oligonükleotid probalar ile yapılan DNA hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır (53). Günümüzde ise konvansiyonel PZR ve real-time PZR gibi farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır (75).

Ciddi TK-MRSA infeksiyonlarının prevalansında ve dünyanın her tarafından raporlanan ölümlerde hızlı artış, bu potansiyel virulan patojenin kontrolünde PVL taşıyan *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasında basit ve hızlı bir metodun önemini işaret etmektedir (57). Çalışmada kullandığımız konvansiyonel multipleks PZR yöntemi eş zamanlı olarak metisilin direnç genini ve PVL genini tanımlayabilmekte, bu yöntem uygulanmadan önce izolatlar fenotipik olarak *S. aureus* olarak tanımlandıysa MRSA ile MSSA ayırımına izin verebilmektedir. Multipleks PZR yöntemi, 2004 yılında Kanada Calgary'de TK-MRSA infeksiyon salgınlarının ortaya çıkmasının tanımlanması ve doğrulanmasında kullanılmıştır (57).

Vandenesch ve ark. (85) üç kıtadan 117 TK-MRSA izolatının incelenmesi sonucu 4 önemli bulgu elde etmişlerdir. Tip IV SCC mec kaset gen ve PVL gen bölgelerinin üç kıtadan toplanan TK-MRSA izolatlarınca paylaşılıyor olması ilk elde edilen bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer toksin genlerinin dağılımı ise kıtalara spesifik bulunmuştur. Bu bulgular TK-MRSA patojenleri için tip IV SCC mec kaset gen tipinin ve PVL'nin selektif bir avantaj sunabildiğini göstermektedir. İkinci olarak Avrupa'dan elde edilen TK-MRSA izolatları, Amerika ve Okyanusya'dan elde edilen TK-MRSA izolatlarına göre daha dirençli (kanamisin, tetrasiklin ve fusidik asid gibi antibiyotiklere) gözükse de genel olarak TK-MRSA izolatları beta laktam dışı antibiyotiklere daha duyarlı olmaktadır. Üçüncü olarak her üç kıtadaki TK-MRSA izolatlarının genetik geçmişinin farklılığı, tek bir TK-MRSA klonunun dünyada yayılımının söz konusu olmadığını, eş zamanlı olarak TK-MRSA'ların farklı lokalizasyonlarda ortak evrimini göstermektedir. Dördüncü olarak "Multilocus sequence typing" (MLST) ve Pulsed field jel elektroforez (PFGE) analizleri, TK-MRSA izolatlarının genetik geçmişinin aynı kıtadaki HK-MRSA ile uyuşmadığını göstermektedir. Bu bulgu da TK-MRSA'nın lokal HK-MRSA'dan ortaya çıkmadığını düşündürmektedir. MLST veri analizleri her kıtadaki TK-MRSA'nın diğer kıtalardaki HK-MRSA ya da MSSA ile ortak genetik geçmişi paylaştığını ortaya koymaktadır.

Okuma ve ark. (68) TK-MRSA'ların HK-MRSA'larla karşılaştırıldığında artmış ekolojik uyuma ve daha kısa ikiye bölünme zamanına sahip olduğunu ileri sürmektedirler.

PVL ve TK-MRSA arasındaki güçlü epidemiyolojik bağlantı hastalık esnasında ve patogeneizde PVL'nin önemli bir rol oynamasıyla ilgili şüpheleri ortadan kaldırmıştır. Bununla birlikte PVL'nin patogeneizde kesin rolü tam olarak açıklanamamaktadır. Son kanıtlar, PVL'nin PMNL'ler ve/veya monositlerdeki yıkım ve inflamasyonu indüklemesine ek olarak diğer virulans faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak dolaylı olarak da virulansın artışına katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Moleküler epidemiyolojinin ve ek olarak izogenik pvl-pozitif ve pvl-negatif bakteriyel izolatların hayvan infeksiyon modellerinde kullanıldığı çalışmaların izlenmesiyle patogeneiz daha net anlaşılabilir (9, 87).

TK-MRSA'nın yayınlanan prevalans oranları çeşitli çalışmalarda kullanılan farklı tanımlamalara bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (49).

Lina ve ark. (53) tarafından 172 *S. aureus* izolatı PVL geninin görüntülenmesi için PZR yöntemi ile incelenmiştir. PVL geni fronkülle ilişkili izolatların %93'ünde, hepsi toplum kaynaklı ağır nekrotizan pnömoniyle ilişkili izolatların %85'inde saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda, PVL'nin esas olarak deri ya da mukozayı içeren nekrotik lezyonlarla ve toplum kaynaklı pnömoniyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Holmes ve ark. (39) 2002 yılında İngiltere ve Galler'de *S. aureus* izolatlarında PVL gen sıklığını araştırmak için yaptıkları çalışmada, seçilen 515 izolattan 8 (%1.6)'inde PVL gen varlığını pozitif bulmuşlardır. PVL geninin stafilkokal hastalıklarda dağılımını saptamak için seçilen 470 izolattan 23 (%4.9)'ünde PVL'yi pozitif bulmuşlardır. Pozitif olan 23 izolatın 15 (%65)'ini deri ve yumuşak doku örneklerinden elde edilen izolatlar oluşturmuştur. Kalan izolatlardan 4'ü pnömonili olgulardan, 2'si yanık infeksiyonlarından, 1'er tanesi de bakteriyemili ve soyulmuş deri sendromlu hastalardan elde edilmiştir.

İngiltere'de PVL üreten geni taşıyan *S. aureus* izolatların prevalansı %2'nin altındadır ve bunların çoğu MSSA'dır. ABD'nin bazı bölgelerindeki Acil Servis'lerde karşılaşılan ciddi *S. aureus* infeksiyonlarının çoğundan TK-MRSA sorumludur (65).

Hong Kong Halk Sağlığı Laboratuvar'ında TK-MRSA olduğu varsayılan 140 izolat 2006 yılı süresince incelendiğinde, 42 (%30) izolatın PVL geni taşıdığı saptanmıştır. Bunların arasında SCCmec tip IV %71.4 ve SCCmec tip V %28.6 oranında bulunmuştur. PVL pozitif MRSA izolatlarının %88.1'i deri ve yumuşak doku örnekleri, %7.1'i kan kültürü, %2.4'ü eklem aspiratı ve %2.4'ü göz örneklerinden elde edilmiştir(14).

Krzywanek ve ark. (51) 2001-2006 yılları arasında Avusturya'da, 1150 MRSA izolatında PVL gen varlığını incelemişler ve 94 PVL pozitif izolat tanımlamışlardır. Bunların %10.6'sı steril vücut sıvılarından, %84.1'i steril olmayan alanlardan elde edilmiştir. Otter ve ark. (69) 2000-2006 yılları arasında toplanan 194 siprofloksasin duyarlı MRSA izolatında PVL oranını %25.3 olarak saptamışlardır. Jones ve ark. (40) 2005 yılında komplike olmayan deri ve derinin yapısal infeksiyonlarından izole edilen 190 *S. aureus* izolatını incelemişlerdir. 101 MRSA izolatından 77'si TK-MRSA olarak kabul edilmiş ve bu toplum kaynaklı izolatlarda PVL pozitiflik oranı %95 oranında saptanırken 89 MSSA izolatında ise % 17 oranında saptanmıştır.

Cercenado ve ark. (12) İspanya'da yaptıkları araştırmada, 3 yıllık süreçte Acil Servis'e başvuran hastalardan üçden fazla antibiyotik grubuna dirençli olarak buldukları MRSA'ları çalışma kapsamına almışlardır. 53 MRSA izolatının 13'ünde (%24) PVL toksin varlığını saptamışlardır. Tüm PVL pozitif MRSA izolatlarının toplum kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir. İzolatların 5'i tetrasiklin ve doksisikline dirençliyken bir tanesi fusidik aside dirençli bulunmuştur. İzolatların 11'i piyojenik deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla ilişkili bulunmuştur. PVL pozitif 9 hastanın Güney Amerika'dan olması PVL pozitif TK-MRSA'nın kıtalar arası yayılımına dikkat çekmektedir.

Denis ve ark. (16) 2002-2004 yılları arasında Belçika'lı hastalardan topladıkları 41 klinik MRSA izolatının 16'sının (%40) PVL toksin geni taşıdığını bulmuşlardır. PVL toksin geni pozitif bulunan izolatların biri dışında hepsi toplumdaki kazanılmıştır. Japonya'da 1979-1985 yılları arasında izole edilen 97 MRSA izolatının 44'ünde (%45.3) PVL pozitifliği saptanmıştır (55). Kanada Calgary'de 1999-2003 yılları arasında toplanan izolatlardan seçilen 287 MRSA ve 280 MSSA izolatında PVL pozitiflik oranları sırasıyla %1.9 ve %2.1 olarak bulunmuştur (57).

Ülkemizde TK-MRSA yaygın değildir. Literatürde ülkemizde yapılmış SCCmec tipi, PVL saptanması ve MLST analizinin birlikte değerlendirildiği bir

çalışmaya rastlanmamaktadır. MRSA izolatlarının bu yöntemlerle incelenmesi toplum kaynaklı izolatların varlığını kanıtlayabilmektedir (34).

Kılıç ve ark. (47) 4 yıllık dönemde 385 MRSA izolatını incelemiş ve 5 (%1.3) izolatta PVL pozitifliği bulmuşlardır. Özkul ve ark. (70) 79 MSSA izolatının 6'sında PVL'yi pozitif bulmuşlar ve 55 MRSA izolatının hiçbirinde PVL geni pozitif bulunamamıştır. Karahan ve ark. (42) 261'i MRSA (230'u hastane kaynaklı, 74'ü toplum başlangıçlı), 43'ü MSSA olmak üzere toplam 304 *S. aureus* izolatının 12'sinde (1'i hastane kaynaklı, 11'i toplum kaynaklı) PVL pozitifliği saptamışlardır. PVL pozitif izolatların 8'i MRSA, 4'ü ise MSSA'dır. PVL pozitif izolatların 7'si yara örneklerinden, 4'ü idrar örneğinden, 1'i ise sinoviyal sıvıdan izole edilmiştir. Yaptığımız çalışmada kullanılan 130 MRSA izolatının 2'sinde, 20 MSSA izolatının ise 1'inde PVL gen pozitifliği saptandı. MRSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatların elde edildiği örneklerden 1'i Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan örneğiydi, diğeri ise Plastik Cerrahi Servisi'nden gönderilen yara örneğiydi. MSSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatın tanımlandığı örnek ise Kardiyoloji Servisi'nden gönderilen idrardı. PVL pozitif izolatların 3'ü de tetrasikline dirençli bulunmuştur. MRSA'lar arasında PVL geni saptanan Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan izolatu, tetrasiklinin yanı sıra gentamisine ve siprofloksasine de dirençli bulunmuştur.

Bazı hastane başlangıçlı MRSA infeksiyonları toplum kaynaklı organizmalardan kaynaklanabilir ve bazı toplum başlangıçlı MRSA infeksiyonları da hastane kaynaklı organizmalardan kaynaklanabilir (29). Mikrobiyolojik ve moleküler veriler olmaksızın sadece epidemiyolojik bilgiye dayalı CDC kriterleri tek başına TK-MRSA'yı tanımlamada yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı klinik, epidemiyolojik ve mikrobiyolojik bilginin sentezi TK-MRSA'nın tanımlanmasında kullanılmalıdır (60, 69).

Toplum kaynaklı ve nozokomiyal infeksiyonlardan PVL pozitif MRSA'nın tanımlanması, diğer hastaların ve personelin korunması için sıkı infeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının gerekliliği kadar bu hastaların ve temas ettikleri kişilerin uygun tedavisine başlanması açısından da önemlidir (56). İlaça dirençli bakterilerin kontrolündeki en etkili yöntem bu bakterilerin hastaneye girişlerinin azaltılmasıdır (13). TK-MRSA izolatlarının hastanede yayılımı metisiline dirençli izolatların sıklığını arttırabilecektir. Aynı zamanda topluma geçiş kapasitesi artmış çoklu ilaca dirençli

izolatların seçimine de yol açabilecektir. Bu sonuç da toplum kaynaklı stafilokokal infeksiyonların tedavisinde artık ampirik beta laktam kullanımının daha fazla mantıklı olamayacağını göstermekle beraber kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testine gereksinimi ortaya çıkarmaktadır (10). MRSA kontrolünde anahtar parametreler el hijyeni, temas izolasyonu, dekolonizasyon ve aktif sürveyans olarak sıralanabilir (88). Hollanda’da MRSA’ların kontrolünde “yakala ve yok et” stratejisi izlenmektedir (23). Dekolonizasyon amacıyla nazal mupirosin ve klorheksidinle duş önerilmektedir (7). Ancak futbol takımlarında ortaya çıkan TK-MRSA infeksiyonlarına bağlı salgınlarda infekte futbolcuların burunlarında salgınlı ilişkili MRSA klonunun saptanmaması patogenezde burun dışı kolonizasyonun önemli olabileceğini işaret etmektedir (15).

Bazı hastanelerde TK-MRSA izolatları klasik hastane kaynaklı MRSA izolatları ile yer değiştirmektedir (49). Hastanelerdeki TK-MRSA’ya bağlı salgınlara raporlanması ve hastanelerdeki izolat yapısındaki değişikliklerin TK-MRSA lehine dönmesindeki ilk belirtiler bu pek hoş olmayan durumun habercisidir. Toplum izolatlarının yüksek patojenitesine bağlı olarak MRSA yaygın fırsatçı davranış profilini değiştirmekte, ciddi hastalığı olmayan ve hatta sağlık hizmetlerinde çalışanlarda da infeksiyonlara neden olmaktadır (33).

USA300’de beta laktam dışı çeşitli sınıf antimikrobiyallere direnç MRSA’nın toplum izolatlarında beklenmedik bir durumdur. USA300’deki çoklu ilaca dirençli konjugatif plazmid pUSA03, vankomisin direnç transpozonu alıcısı olarak görev yapabilmektedir. Sağlık kuruluşlarında hem USA300’ün hem de vankomisin dirençli enterokok türlerinin prevalanslarındaki artış düşündürücüdür (18). Bu durum göz önünde tutulduğunda vanA genini de kazanabilecek çoklu ilaca dirençli TK-MRSA’lardan korkulması gerekmektedir (38).

Tıbbi kayıtlarda sağlık hizmetleri risk faktörleriyle ilgili bilgiler yetersiz tutulmuş olabileceğinden TK-MRSA insidansı fazla tahmin edilebileceği gibi tersi de söz konusu olabilmektedir (48, 62). Hastaneye kabulden sonraki zaman, yakın zamandaki sağlık hizmet alımıyla ilgili bilgilerin yetersizliği ve diğer sağlık hizmetleriyle ilgili risk faktörlerini içeren bilgilerdeki eksikliklere bağlı epidemiyolojik tanımlamalar, TK-MRSA’ların yayılımının düşük tahmin edilmesine yol açabilmektedir (10).

PVL pozitif MRSA epidemiyolojisini daha iyi anlayabilmek için yeterli risk faktör analizlerinin yapıldığı popülasyon bazlı çalışmaların yanı sıra hasta bazlı çalışmalara da ihtiyaç vardır (51).

7-SONUÇLAR

- Multipleks PZR ve single target PZR yöntemleri kullanılarak 130 MRSA izolatının 2'sinde, 20 MSSA izolatının 1'inde PVL varlığı saptandı.
- MRSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatların elde edildiği örneklerden 1'i Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan örneğiydi, diğeri ise Plastik Cerrahi Servisi'nden gönderilen yara örneğiydi.
- MSSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatın elde edildiği örnek ise Kardiyoloji Servisi'nden gönderilen idrardı.
- PVL pozitif izolatların 3'ü de tetrasikline dirençli bulunmuştur. MRSA'lar arasında PVL geni saptanan Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan izolatı tetrasiklinin yanı sıra gentamisine ve siprofloksasine de dirençli bulunmuştur.
- PVL pozitif izolatların hastalıklarla ilişkisi, antimikrobiyal direnç profili ve yayılımlarının izlenmesi amacıyla sürveyans son derece önemlidir.
- PVL pozitif izolatların prevalansını, genetik karakteristiklerini öğrenmek ve bu izolatların hem toplumda hem de hastane ortamında yayılımlarını önlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

8-KAYNAKLAR

1. Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pedelacq JD, Samama JP, Sanni A, Monteil H, Prevost G. Decoupling the Ca⁺² -activation from the pore-forming function of the bi-component Panton-Valentine leukocidin in human PMNs. Federation of European Biochemical Societies. 1999; 461: 280-286.
2. Badiou C, Dumitrescu O, Croze M, Gillet Y, Dohin B, Slayman DH, Allaouchiche B, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Panton–Valentine leukocidin is expressed at toxic levels in human skin abscesses. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14: 1180–1183.
3. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*. Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Edition. Volume 1 ASM Press Washington, D.C. 2007; 390-411.
4. Berglund C, Mölling P, Sjöberg L, Söderquist B. Multilocus Sequence Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from an Area of Low Endemicity by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43: 4448-4454.
5. Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.
6. Bonnstetter KK, Wolter DJ, Tenover FC, McDougal LK, Goering RV. Rapid Multiplex PCR Assay for Identification of USA300 Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 141–146.
7. Boubaker K, Diebold P, Blanc DS, Vandenesch F, Praz G, Dupuis G, Troillet N. Panton-Valentine Leukocidin and Staphylococcal Skin Infections in Schoolchildren. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10: 121-124.
8. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46(Suppl5): S344–9.
9. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*. 2007; 87: 3-9.

10. Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Community-Adapted Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Population Dynamics of an Expanding Community Reservoir of MRSA. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004; 190: 1730–8.
11. Cengiz AT: Staphylococcus. In: Ustaçelebi Ş , Cengiz TA (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi*. Ankara. 1999; 339-346.
12. Cercenado E, Cuevas O, Marin M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, Padilla B, Vindel A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008; 61:143-9.
13. Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA, Ng VL, Chansky K, Edlin B, Chambers HF. Origins of Community Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39: 47–54.
14. Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Tsang VY, Lo JY. Panton–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Hong Kong. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57: 1440-43.
15. Decker CF. Pathogenesis of MRSA Infections. *Dis. Mon*. 2008; 54: 774-779.
16. Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, Hallin M, Huysmans G, Garrino MG, Glupczynski Y, Malaviolle X, Vergison A, Struelens MJ. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leukocidin genes in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56: 1103–1106.
17. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 Virulence Genes in the Evolution of Hospital- and Community-Associated Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006; 193: 1495–1503.
18. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan THV, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006; 367: 731–39.

19. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 2008; 16:361-9.
20. Dolapçı İ. İn Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Ankara. Palme Yayınları. 2006; 43-69.
21. Durmaz R, Ayan M. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde ‘Arbitrarily Primed’ PZR ve ‘Pulsed –Field Gel’ Elektroforezi. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Ankara. 2001:219-228
22. Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok İnfeksiyonları. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul. 2008; 2065-2077.
23. Editorial. MRSA: how politicians are missing the point. *Lancet*. 2005; 365: 273–75.
24. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*. 2002; 99: 7687-7692.
25. Farley JE. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment options for skin and soft tissue infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 2008; 20: 85–92.
26. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus, micrococcus, and similar organisms*. Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology. St.Louis, Missouri. Mosby Elsevier. 12th edition. 2007; 254-63.
27. Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier AL, Eyssade N, Peyrol S, Etienne J, Lina G. Neutralization of *Staphylococcus aureus* PantonValentine Leukocidin by Intravenous Immunoglobulin In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189: 346–53.
28. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 3117-3127.

29. Gerberding JL, Chambers HF. Community-Onset Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Scheld WM, Craig WA, Hughes JM. Emerging Infections 5. ASM Press. Washington, D.C. 2001; 85-93.
30. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clinical Infectious Diseases. 2008; 46 (Suppl 5): 350–9.
31. Gorwitz RJ, Jernigan DB, Powers JH, Jernigan JA and Participants in the Centers for Disease Control and Prevention-Convened Experts' Meeting on Management of MRSA in the Community. Strategies for Clinical Management of MRSA in the Community: Summary of an Experts' Meeting Convened by the Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. 2006; 1-24.
32. Gouaux E, Hobaugh M, Song L. Alfa-hemolysin, gama hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: Distant in sequence but similar in structure. Protein Science 1997; 6: 2631-2635.
33. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet. 2006; 368: 874-85.
34. Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç Ve Epidemiyoloji. ANKEM Derg 2008; 22(Ek 2): 276-286.
35. Gür D. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2008;39-52.
36. Gür D. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onsekizinci Bilgi Eki. M100-S18 Clinical and Laboratory Standarts Institute. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara. 2008; 28: 46-52.
37. Gürler N. Toplumsal Kaynaklı MRSA İnfeksiyonlarının Mikrobiyolojisi. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı. Ed. Ağaçfidan A, Erturan Z. İstanbul 2008; 299-305.
38. Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. British Journal of Pharmacology. 2008; 153: S406–S413.

39. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* Isolates Carrying Panton-Valentine Leucocidin Genes in England and Wales: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43: 2384–2390.
40. Jones RN, Nilius AM, Akinlade BK, Deshpande LM, Notario GF. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from a 2005 Clinical Trial of Uncomplicated Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51: 3381–3384.
41. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial Two-component and Hetero-heptameric Pore-forming Cytolytic Toxins: Structures, Pore-forming Mechanism, and Organization of the Genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2004; 68: 981-1003.
42. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine Leukocidin Genes and SCCmec Types in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates from Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2008; 14: 203-210.
43. Karchmer AW, Bayer AS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Clinical Challenge. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46(Suppl5): 342–3.
44. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44: 1549-1555.
45. Kaygusuz A. Antibiyotik Duyarlılık Deneyi Sonuçları Tedavide Kullanılırken Nelere Dikkat Edilmelidir? Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. 2008; 53-79.
46. Kılıç A. Metisiline Direçli *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi. 5.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Bildiri Özetleri Kitabı. Ankara. 2008; 85-90.
47. Kilic A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008; 94: 607–614.

48. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-1771.
49. Kluytmans-VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clinical Microbiology and Infection. 2006; 12(Suppl 1): 9-15.
50. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Gram positive cocci Part I: Staphylococci and related gram positive cocci. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott. 2006; 623-662.
51. Krziwanek K, Luger C, Sammer B, Stumvoll S, Stammler M, Metz-Gercek S, Mittermayer H. PVL-positive MRSA in Austria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26: 931–935.
52. Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS, Park YH. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56: 624-632.
53. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clinical Infectious Diseases. 1999; 29:1128-32.
54. Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, Drubel I, Tanzer J, Reischl U, Raab U, Höller C, Naber KG, Witte W, Hanses F, Salzberger B, Lehn N. Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24: 419–422.
55. Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K. Molecular epidemiology of Japanese hospital MRSA 1979-85.-Predominance of Panton-Valentine leukocidin positive clones. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4515-27.

56. Maier J, Melzl H, Reischl U, Drubel I, Witte W, Lehn N, Linde H. Panton–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Germany associated with travel or foreign family origin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24: 637–639.
57. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin Genes and Simultaneous Discrimination of Methicillin-Susceptible from -Resistant Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 1141-1144.
58. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR, Levett PN, Horsman GB. Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of Panton-Valentine Leukocidin Toxin Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 6147-6149.
59. Melles DC, van Leeuwen WB, Boelens HAM, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. Panton-ValentineLeukocidin Genes in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12: 1174-1175.
60. Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Journal of Hospital Infection* 2007; 67: 109-113.
61. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 6th edition. Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia : Elsevier; 2005; 2321-2351.
62. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O’Boyle C, Danila RN, Lynfield R. Comparison of Community and Health Care–Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *JAMA*. 2003; 290: 2976-2984.
63. Nakagawa S, Taneike I, Mimura D, Iwakura N, Nakayama T, Emura T, Kitatsuji M, Fujimoto A, Yamamoto T. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine leukocidin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 328: 995–1002.

64. Narita S, Kaneko J, Chiba J, Piemont Y, Jarraud S, Etienne J, Kamio Y. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage ϕ SLT. *Gene*. 2001; 268: 195-206.
65. Nathwani D, Morgan M, Masterton RG, Dryden M, Cookson BD, French G, Lewis D. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 61: 976–994.
66. Navarro MB, Huttner B, Harbarth S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in the 21st century: beyond the acute care hospital. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008; 21: 372-379.
67. Oishi K, Baba T, Nakatomi Y, Ito T, Hiramatsu K. A latex agglutination assay for specific detection of Panton–Valentine leukocidin. *Journal of Microbiological Methods*. 2008; 75: 411-415.
68. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O’Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40: 4289–94.
69. Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14: 670–676.
70. Ozkul H, Oktem IM, Gulay Z. Investigation of the presence of panton-valentin leukocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol. Bul*. 2007; 41: 357-62.
71. Özgünen T. Gram-Pozitif Koklar. Levinson W. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Dokuzuncu Baskı. Güneş Tıp Kitabevleri. Ankara. 2008; 106-118.
72. Panton PN, Valentine FCO. Staphylococcal Toxin. *Lancet*. 1932; 506-508.
73. Pédelacq JD, Maveyraud L, Prévost G, Baba-Moussa L, González A, Courcelle E, Shepard W, Monteil H, Samama JP, Mourey L. The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure*. 1999; 7: 277-287.

74. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, Monteil H, Piemont Y. Panton-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 Are Encoded by Distinct Genetic Loci and Have Different Biological Activities. *Infection and Immunity*. 1995; 63: 4121-4129.
75. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H. Rapid detection of Panton–Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26: 131–135.
76. Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwards G, O’Brien FG, Tenover FC, McDougal LK, Monk AB, Enright MC. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet*. 2005; 365: 1256–58.
77. Saiman L, O’Keefe M, Graham PL, Wu F, Said-Salim B, Kreiswirth B, LaSala A, Schlievert PM, Della-Latta P. Hospital Transmission of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* among Postpartum Women. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 37:1313–9.
78. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings, 2006. *American Journal of Infection Control*. 2007; 35: 165-193.
79. Smith CS, Parnell P, Hodgson G, Darby B, Barr B, Tompkins D, Heritage J, Wilcox MH. Are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that produce Panton–Valentine leucocidin (PVL) found among residents of care homes?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 62: 968–972.
80. Thuong CT, Tho ND, Hoa NT, Phuong NTM, Van Tuan L, To SD, Lindsay J, Nguyen TD, Bach V, Le QT, Le TH, Le DL, Campbell J, Nguyen TK, Nguyen VV, Cockfield J, Le TG, Phan VN, Le HS, Huynh TS, Le VP, Counahan M, Bentsi-Enchill A, Brown R, Simmerman J, Nguyen TC, Tran TH, Farrar J, Schultsz C. An Outbreak of Severe Infections with Community-Acquired MRSA Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Following Vaccination. *Plos One*. 2007; 9: e822.
81. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2004; 9-22.

82. Usluer G. *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu İnfeksiyonlar. Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004; 39-53.
83. Ünal S. *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları.. Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004; 23-38.
84. Ünal S. Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*: Genetik Özellikler. Ankem derg 2006; 20(ek 2): 100-101.
85. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. Emerging Infectious Diseases. 2003; 9: 978-84.
86. Ward PD, Turner WH. Identification of Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin as a Potent Dermonecrotic Toxin. Infection and Immunity. 1980; 27: 393-97.
87. Wardenburg JB, Bae T, Otto M, DeLeo FR, Schneewind O. Poring over pores: α -hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. Nature Medicine. 2007; 13: 1405-6.
88. WHO Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe. 2004. Communicable Disease Surveillance And Response Department Of Essential Drugs And Medicines Policy. 2004; 1-25.
89. www.advandx.com/uploads/documents/asm2006posterpvlcedarssinaifinal.pdf