

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ ERİŞKİN HASTANESİ'NDE
2004-2005 YILLARINDA HASTANE KAYNAKLI
İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) SUŞLARININ
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ**

**Dr. Hadim AKOĞLU
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2007

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ ERİŞKİN HASTANESİ'NDE
2004-2005 YILLARINDA HASTANE KAYNAKLI
İNFEKSİYONLARDAN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) SUŞLARININ
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ

Dr. Hadim AKOĞLU
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serhat ÜNAL
Doç. Dr. Pınar ZARAKOLU

ANKARA

2007

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince eğitimimde ve tezimle ilgili çalışmalarımda bana her türlü yardımda bulunan tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Serhat Ünal'a, çalışmanın her aşamasındaki değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Pınar Zarakolu'na, tüm laboratuvar çalışması boyunca gösterdikleri üstün destek ve yardımlarından dolayı Biol. Belgin Altun ve Teknisyen Gülden Kaya'ya, çalışmanın uygulama aşamasındaki değerli destekleri için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zeynep Gülay'a, Klinik Patoloji Laboratuvarı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. Gülşen Haşçelik'e, tez süresince gösterdikleri anlayış ve destekleri için tüm Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi ve Nefroloji Ünitesi öğretim üyeleri ve çalışanlarına, tez çalışmamın başından itibaren desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Dr. Gülşen Akoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Akoğlu H., Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde 2004-2005 yıllarında Hastane Kaynaklı İnfeksiyonlardan İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Uzmanlık Tezi. Ankara, 2007.

Bu çalışmada Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde yatan, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nce takip edilen hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden üreyen hastane kaynaklı (HK) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının Panton-Valentine Lökosidin (PVL) gen ve stafilokokal kromozom kaset *mec* (SSC*mec*) tiplendirmesi yapılarak moleküler özelliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Moleküler özellikler ile klonalite ve antibiyotik duyarlılığının ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 110 MRSA suşu çeşitli klinik örneklerden (35 kan, 37 püy, 23 derin trakeal aspirasyon, 5 kateter, 10 diğer) izole edilmiştir. Her hastadan yalnız bir izolat çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların identifikasyonu Sceptor otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile yapılmıştır. İzolatlar çalışma gerçekleştirilinceye dek -80°C'de saklanmıştır. Metisiline direnç durumunu saptamak amacıyla "Clinical Laboratory Standards Institute" (CLSI) önerilerine uygun olarak oksasilin (1µg, Oxoid, İngiltere) diskleri kullanılarak disk difüzyon ve *mecA* varlığını saptamak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılmıştır. Çeşitli antibiyotiklere duyarlılık CLSI önerilerine uygun olarak disk difüzyon ve Etest (AB Biodisk, İsveç) yöntemleriyle belirlenmiştir. Klonal farklılıkların değerlendirilmesi için pulsed field gel elektroforezi (PFGE) uygulanmıştır. PVL gen varlığının ve SSC*mec* tiplerinin saptanması için yine PZR yöntemi kullanılmıştır. Kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 27R ve *S. aureus* 8328 kullanılmıştır.

Çalışmaya alınan HK-MRSA suşlarının tümünde *mecA* geni pozitifdir. İzolatların 68'i (%61.8) SSC*mec* tip III, 38'i (%34.5) SSC*mec* varyant tip IIIB ve 3'ü (%2.7) SSC*mec* tip IV olarak saptanmıştır. Bir izolatın SSC*mec* geni tiplendirmesi yapılamamıştır. PVL geni toplam 14 suşta (%12.7) pozitif bulunmuştur. PVL pozitif

suşların 10'u SCC*mec* III, 4'ü SCC*mec* varyant tip IIIB olarak saptanmıştır. SCC*mec* tip IV olarak saptanan suşların hiçbirinde PVL geni gösterilememiştir.

Tüm MRSA izolatlarının tigesiklin, linezolid, vankomisin ve teikoplanine duyarlı olduğu, sırasıyla MİK₉₀ (µg/ml) değerlerinin 0.25, 2, 2 ve 2 olduğu tespit edilmiştir. İzolatların gentamisin, siprofloksasin, rifampine yüksek oranda (>%90) dirençli olduğu, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX)'e %90, klindamisine %53, eritromisine %32 oranında duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar PFGE paternlerine göre 8 klonu ayırt edilmiştir (A, B, C, D, K, L, N, O). İzolatların tümü ele alındığında %92.7'sinin, PVL pozitif olanların ise %78.7'sinin klon A'ya ait olduğu saptanmıştır. SCC*mec* III taşıyan suşların %91, SCC*mec* IIIB taşıyan suşların %94.7, SCC*mec* IV taşıyan suşların %100 oranında klon A'ya ait olduğu belirlenmiştir. PVL negatif suşların siprofloksasin direnci %98, rifampisin direnci %92.7, gentamisin direnci %88.5, eritromisin direnci %66, klindamisin direnci %37, TMP-SMX direnci %8 oranındadır. PVL pozitif izolatların ise direnç oranları siprofloksasin, rifampisin, gentamisin, eritromisin, klindamisin, TMP-SMX için sırasıyla %92.8, %92.8, %85.7, %78.5, %50, %21.4 olarak belirlenmiştir.

Hastanemizde çeşitli infeksiyonlardan izole edilen HK-MRSA izolatları çoklu dirence sahiptir. Bu izolatların büyük çoğunluğunun SCC*mec* III, veya varyant tip IIIB taşıdığı saptanmıştır. Toplum kökenli MRSA'nın bilinen bir virulans faktörü olan PVL, HK-MRSA izolatlarında da önemli oranda saptanmıştır. Bu durum MRSA izolatlarının değişen epidemiyolojisinin yakından takibinin önemli bir göstergesidir.

Anahtar kelimeler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, stafilokokal kromozom kaset *mec*, Panton-Valentine Lökosidin

ABSTRACT

Akoglu H., Molecular Characteristics of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated at Hacettepe University Adult Hospital in 2004-2005, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Internal Medicine, Ankara, 2007.

The aim of this study was to determine the molecular characteristics of hospital-acquired (HA)-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates by determination of the presence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes and staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) typing in association between clonal diversity and antibiotic susceptibilities.

A total of 110 MRSA isolates from various clinical samples (35 blood, 37 pus, 23 deep tracheal aspiration, 5 catheter, and 10 other samples) of inpatients with nosocomial infections at Hacettepe University Adult Hospital between January 2004 and December 2005 were included in the study. Only one isolate from each patient was included. The identification of the isolates was made by Sceptor automated system (Becton Dickinson, USA). The isolates were retested for methicillin resistance by oxacillin (1µg, Oxoid, UK) disk diffusion test according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and for the presence of *mecA* gene by polymerase chain reaction (PCR). The presence of PVL genes and SCC*mec* types were detected also by PCR analysis. The susceptibility testing was performed by Etest (AB Biodisk, Sweden) and to some other antibiotics by disk diffusion methods according to the CLSI recommendations. Pulse field gel electrophoresis (PFGE) was performed to examine the clonal diversity of the isolates. Isolates were stored at -80°C until studied. *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 27R and *S. aureus* 8328 were included as control strains.

All 110 HA-MRSA isolates were positive for *mecA* gene. Of the isolates, 68 (61.8%) were harbouring SCC*mec* type III, 38 (34.5%) SCC*mec* variant IIIB, and 3 (2.7 %) SCC*mec* type IV. One isolate could not be typed for SCC*mec* gene. PVL was positive in 14 (12.7%) of 110 HA-MRSA isolates. Ten of PVL positive strains carried SCC*mec* III, whereas 4 of them carried SCC*mec* type variant IIIB. None of the strains harboring SCC*mec* type IV were positive for PVL genes. All MRSA

strains were susceptible to tigecycline, linezolid, vancomycin and teicoplanin with MIC₉₀ (µg/ml) values of 0.25, 2, 2 and 2 respectively. The isolates were highly resistant (>90%) to gentamicin, ciprofloxacin, and rifampin whereas the susceptibility to trimethoprim/sulfamethaxazole was 90%, clindamycin 53% and erythromycin 32%. On the basis of PGFE patterns, the MRSA isolates were grouped into eight clonal types (A, B, C, D, K, L, N, O). Of the total isolates 92.7%, of the PVL-positive isolates 78.7% belonged to clone A. All strains harboring SCC*mec* IV, 91% of strains harboring SCC*mec* III, and 94.7 of strains harboring SCC*mec* IIIB belonged to clone A. PVL-negative MRSA isolates were resistant to ciprofloxacin, rifampin, gentamicin, erythromycin, clindamycin, and TMP-SMX with the rates 98%, 92.7%, 88.5%, 66%, 37%, and 8% respectively, whereas resistance rates of PVL-positive strains were 92.8% for ciprofloxacin, 92.8% for rifampin, 85.7% for gentamicin, 78.5% for erythromycin, 50% for clindamycin, and 21.4% for TMP-SMX.

All HA-MRSA isolates were multi-resistant. Majority of the HA-MRSA isolates in our hospital were carrying SCC*mec* III, or variant IIIB. Although PVL is known as a common virulence factor of community-acquired MRSA, HA-MRSA isolates in our center have a considerable rate of PVL positivity pointing out the changing epidemiology of MRSA isolates.

Key Words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal chromosome cassette *mec*, Panton-Valentine Leukocidin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metisilin Direncinin Moleküler Mekanizması	3
2.2. Metisilin Direncinin Ekspresyonu	6
2.3. MRSA Epidemiyolojisi	10
2.4. TK-MRSA	13
2.5. TK-MRSA'nın Moleküler Özellikleri	14
2.6. TK-MRSA'nın Virulans Faktörleri	17
2.7. Epidemiyoloji	18
2.8. TK-MRSA'ya Bağlı İnfeksiyonlar ve Klinik Özellikleri	20
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
3.1. <i>S. aureus</i> İdentifikasyonu	22
3.2. Antibiyotik Duyarlılığı	22
3.3. PZR için Bakteri DNA'sının İzolasyonu	23
3.4. <i>mecA</i> Geninin Varlığının Araştırılması	23
3.5. PVL Genlerinin Varlığının Araştırılması	24
3.6. <i>SCCmec</i> Genlerinin Varlığının Araştırılması	25
3.7. Pulsed-Field Jel Elektroforezi	28
3.8. Etik Kurul İzni	29
4. BULGULAR	32
4.1. <i>SCCmec</i> Tiplendirmesi	32
4.2. PVL genlerinin tespiti	32

4.3. Pulsed-Field Jel Elektroforezi	35
4.4. Antibiyotik Duyarlılığı	38
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR	47
7. KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BAS	Büyük acil servisi
BCDBÜ	Beyin cerrahisi devamlı bakım ünitesi
BCS	Beyin cerrahisi servisi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CDBÜ	Cerrahi devamlı bakım ünitesi
CDC	Centers for Infectious Disease Control and Prevention
cfu	Colony forming unit
cipro	Siprofloksasin
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DDBÜ	Dahiliye devamlı bakım ünitesi
DTA	Derin trakeal aspirasyon
eritr	Eritromisin
GCDBÜ	Genel cerrahi devamlı bakım ünitesi
gen	Gentamisin
HA-MRSA	Hospital-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HK-MRSA	Hastane kaynaklı metisiline dirençli <i>staphylococcus aureus</i>
J	Junkyard
KBBS	Kulak burun boğaz servisi
KDCS	Kalp damar cerrahisi servisi
klin	Klindamisin
line	Linezolid
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , metisiline dirençli <i>staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> , metisiline duyarlı <i>staphylococcus aureus</i>
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polymerase chain reaction

PCS	Plastik cerrahi servisi
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PVL	Panton-Valentine leukocidin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rif	Rifampisin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEC	Stafilokokal enterotoksin C
SSC<i>mec</i>	Stafilokokal kaset kromozom <i>mec</i>
teiko	Teikoplanin
TK-MRSA	Toplum kökenli metisiline dirençli <i>staphylococcus aureus</i>
TMP-SMX	Trimetoprim-sulfametoksazol
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultraviyole
van	vankomisin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Vahşi-tip <i>S. aureus</i> ve MRSA'da peptidoglikan yapımı	4
2.2. Metisilin direncinin ekspresyonunu etkileyen peptidoglikan Prekürsörleri	5
2.3. SCCmec tip I-V ve varyantlarının genomik organizasyonunu gösteren şematik diyagram	9
2.4. WIS suşuna ait tip V SCCmec elementinin genetik yapısı	10
2.5. Dünyada ülkeler bazında MRSA prevalansı	11
2.6. TK-MRSA suşlarından elde edilen SCCmec elementlerinin diğer üç tip SCCmec elementleri ile karşılaştırılması	16
3.1. Multipleks PCR yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirmesinde pozitif kontrol olarak kullanılan standart suşlar	27
4.1. MRSA suşlarının yıllara göre servislere dağılımı	30
4.2. HK-MRSA suşlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı	31
4.3. Multipleks PZR yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirmesi	32
4.4. PZR yöntemi ile MRSA izolatlarında PVL gen varlığının gösterilmesi	33
4.5. PVL pozitif ve PVL negatif suşların yıllara göre dağılımı	34
4.6. MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin gösterilmesi	36

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. MRSA'da SCC <i>mec</i> Tipleri ve İçerikleri	8
2.2. Toplum kökenli <i>S.aureus</i> 'un virülans faktörleri	19
4.1. MRSA suşlarının izole edildiği servislere ve örnek türlerine göre dağılımı	31
4.2. HK-MRSA suşlarının SSC <i>mec</i> tiplendirmesi ve PVL varlığına göre dağılımı	33
4.3 PVL pozitif MRSA suşlarının servislere ve izole edildikleri örnek türüne göre dağılımları	35
4.4 MRSA suşlarının klonalite, SCC <i>mec</i> tipi, PVL gen varlığı, izole edildiği servis ve örnek türüne göre dağılımı	37
4.5 MRSA suşlarının SCC <i>mec</i> tipleri, PVL gen varlığı, klonalite ve antibiyotik duyarlılığına göre dağılımı	39

1. GİRİŞ

Yarı-sentetik, β laktamaza dayanıklı bir penisilin olan metisiline karşı dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infeksiyonları 1960'lı yılların başından itibaren Avrupa'da tanımlanmaya başlanmıştır (1). Yakın geçmişte dek özellikle hastane kaynaklı infeksiyon etkenleri içinde yerini alan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), günümüzde toplum kaynaklı infeksiyon etkenleri arasında da giderek artan oranda görülmekte, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmakta, yüksek bir ekonomik yük oluşturmaktadır (2). Toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) izolatları genellikle hastane kökenli suşlardan farklı moleküler özellikler ve antimikrobiyal direnç paterni göstermektedir (3).

Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesinde, toplum ve hastane kökenli MRSA izolatları arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamıştır (4). Moleküler tiplendirme yöntemleri olarak günümüzde çoğunlukla DNA'ya dayalı genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) önemli yer tutmaktadır. PZR metisilin direncinin tespitinde, MRSA suşlarının genotiplendirilmesinde ve virulans faktörlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (5,6,7). Metisilin direncini taşıyan *mecA* geninin tümüyle sekanslanarak alt tipleri belirlenmiştir (6). Ayrıca *mecA* geninin de içinde bulunduğu genomik bir ada olan stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC*mec*) tümüyle sekanslanarak genetik yapıdaki varyasyonlara göre sınıflandırılmıştır (8). Bu sınıflandırma, MRSA'nın hastane veya toplum kökenli olarak ayırımında oldukça önemli rol oynamaktadır. TK-MRSA'nın prototipi olan MW2 suşuna bağlı çocuk ölümleri araştırmacıları 1999 yılında harekete geçirmiştir. Kısa zamanda toplum kökenli infeksiyona yol açan prototipin tüm genleri sekanslanmış, virulans genleri ortaya çıkarılmıştır (7). Bunların içinde Panton-Valentine leukocidin (PVL) genleri en önemli virulans faktörü olarak sayılmaktadır. PVL, lökositleri tahrip eden ve doku nekrozuna yol açan bir toksindir (9). Çocuklarda ve genç erişkinlerde deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve ciddi nekrotizan pnömoni ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan birçok çalışmada PVL'nin toplum kaynaklı suşların hemen tümünde

bulunduğu gösterilmiş ve günümüzde hastane kaynaklı suşlardan ayırırnda önemli bir özellik olarak kullanılmaya başlanmıştır.

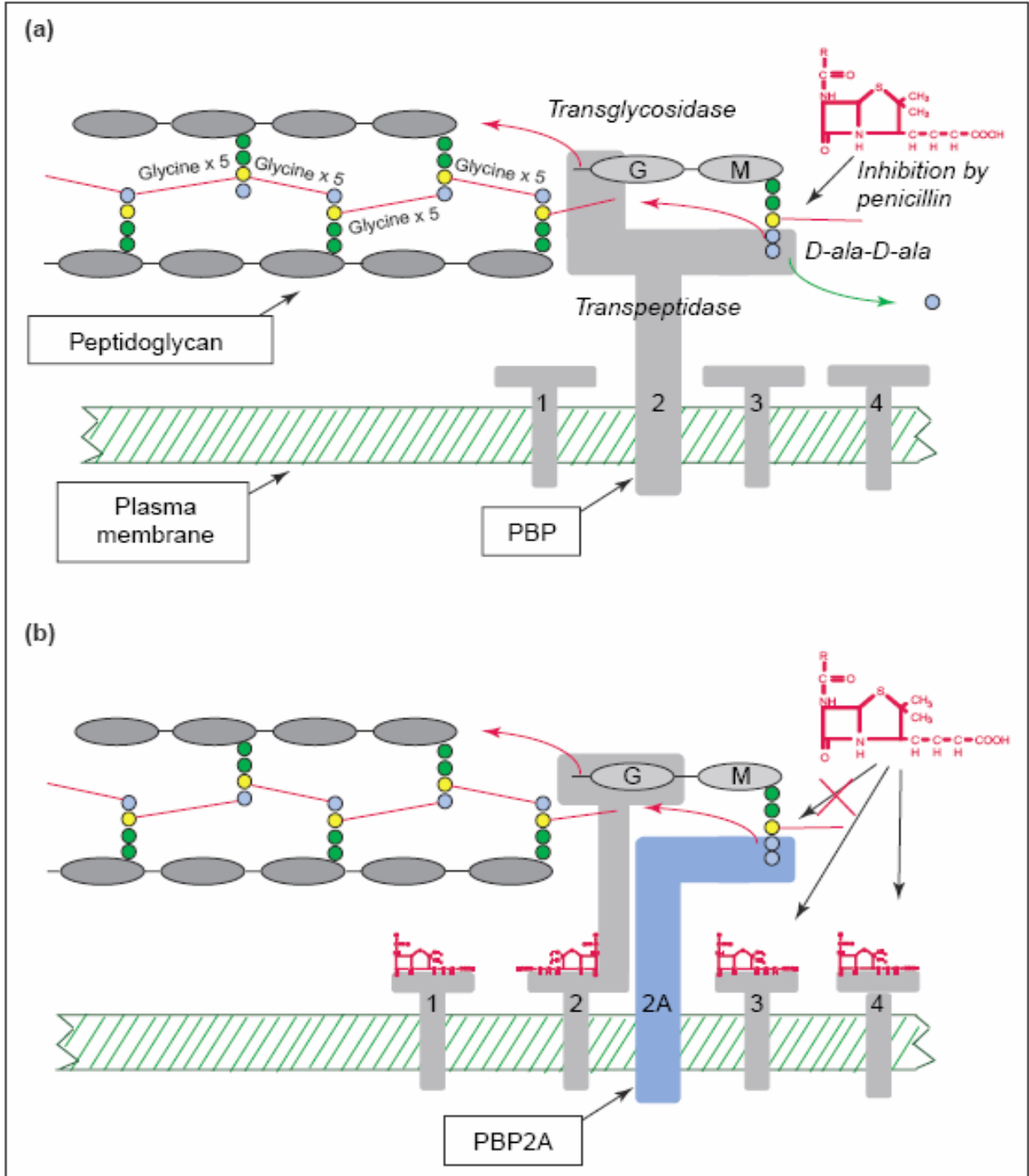
Bu alışmada 1 Ocak 2004–31 Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesi’nde yatmış olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen MRSA suşlarının SCC*mec* tipine göre sınıflandırılmaları ve PVL varlığının araştırılması planlanmıştır. Moleküler tiplendirme, klonalite ile antibiyotik duyarlılığının ilişkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

S. aureus insanlarda görülen majör infeksiyon nedenlerinden biridir. Hastane kaynaklı infeksiyonlara neden olabildiği gibi özellikle deri ve yumuşak doku infeksiyonlarını içeren toplum kaynaklı infeksiyonlara da neden olabilir (10,11). İnsanlar *S. aureus* için doğal rezervuar konumundadır. Asemptomatik kolonizasyon infeksiyona nazaran çok daha sık rastlanan bir durumdur. Kolonizasyon doğumdan hemen sonra görülebilir ve yaşamın ilerleyen dönemlerinde tekrarlayabilir (12). Taşıyıcı sıklığı %25–50 arasında değişmekle birlikte injeksiyon yoluyla ilaç kullananlarda, insülin kullanan diyabetik hastalarda, dermatolojik hastalığı olanlarda, uzun dönem hemodiyaliz kateteri olanlarda ve sağlık çalışanlarında sıklık artış göstermektedir (13). Organizma patojenik potansiyeli ve antimikrobiyal ajanlara karşı sürekli yeni direnç mekanizmaları geliştirebilmesi yönünden oldukça ilgi çekicidir. Metisilin direnci aynı zamanda tüm β laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişimini göstermesi bakımından tedavi ile ilişkili çok ciddi problemleri işaret etmektedir (14).

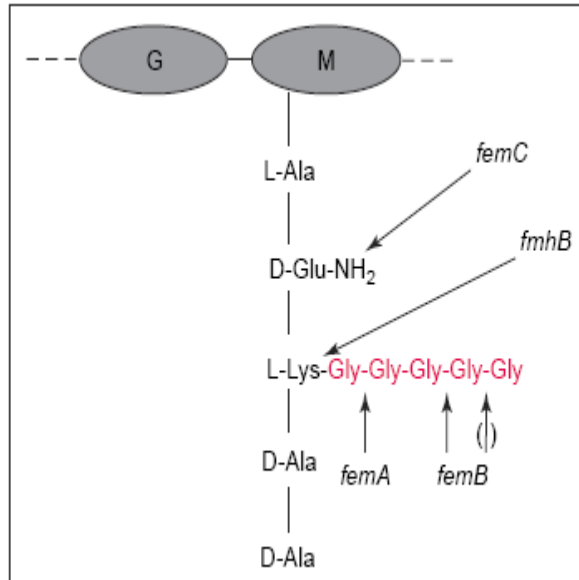
2.1. Metisilin Direncinin Moleküler Mekanizması

S. aureus'un metisilin direnci oksasilin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) $\geq 4\mu\text{g/mL}$ olması şeklinde tanımlanmaktadır (15). Metisilin direnci penisilinaz üretiminden farklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Buradaki temel mekanizma bakteri tarafından β laktam antibiyotiklere karşı düşük afiniteye sahip yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) olan PBP2a sentezine dayanmaktadır. PBP'ler peptidoglikan öncüllerini yapılmakta olan hücre duvarına taşımak ve bağlamakla görevlidirler. Bu proteinlerin bir kısmı iki-fonksiyonlu olup hem transglikozidaz hem de transpeptidaz aktivitesine sahiptir (16). *S. aureus* sadece bir adet iki-fonksiyonlu PBP (PBP2) ve üç adet tek-fonksiyonlu PBP'e sahiptir (PBP 1,3 ve 4) (17). Transpeptidasyon prekürsörün D-ala-D-ala terminalinde gerçekleşir (Şekil 2.1a). Duyarlı stafilokok izolatlarında β laktamlar bu transpeptidasyon basamağını inhibe ederler.



Şekil 2.1. Vahşi-tip *S. aureus* ve MRSA'da peptidoglikan yapımı. (a) Hücre duvarı prekürsörleri disakkarid pentapeptidler olan N-asetil-glukozamin ve N-asetil-muramik asit-L-ala-D-glu-L-lys-D-ala-D-ala. Prekürsörler PBP'ler tarafından hücre duvarı sentezi için kullanılırlar. Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler hem transglukozidaz hem de transpeptidaz aktivitesine sahiptir. (b) MRSA β laktamlara karşı oldukça düşük affinite gösteren PBP2a'ya sahip olduğundan β laktam varlığında diğer PBP'ler inhibe olduğu halde, hücre duvarı sentezine devam eder. (Kaynak 17'den sadeleştirilerek alınmıştır.)

Duvar prekürsörleri ile yarışarak enzimin (PBP) aktif bölgesine bağlanırlar. Ancak doğal prekürsörden farklı olarak bu bağlanma geriye-dönüştürülebilir değildir (kovalan bağ). Böylece PBP aktivitesi kalıcı olarak bloke edilir ve bakteriyel ölüm gerçekleşir. Bakteri duvarındaki peptidoglikanın çapraz bağlanmasını (transpeptidasyon) sağlayan diğer PBP'ler β laktamlar varlığında inaktive olurken, PBP2a β laktamlara karşı affinitesi düşük olduğundan inaktive olmuş PBP'lerin yerine geçerek hücre duvarının sentezini tamamlar (18,19) (şekil 2.1b). Oluşan peptidoglikan yapısal olarak farklı bir muropeptid kompozisyonuna sahip olmakla birlikte hücre fonksiyonları etkilememektedir (20). Ancak PBP2a'nın işlev görebilmesi için özel hücre duvarı prekürsörlerine ihtiyaç vardır. Bunlar normal peptidoglikan prekürsörlerine pentaglisin yan zincir veya amin grubu eklenmesi ile oluşmaktadır (21,22). Tüm bu aksesuar yapıların peptidoglikan prekürsörlerine eklenmesinde bir takım genler rol oynamaktadır. Bunlar arasında *femA*, *femB*, *femC* ve *femB* en önemlileridir (21,23,24). Bu genlerin işlevlerindeki bir bozukluk PBP2a yapımının sürmesine rağmen metisilin direncini azaltmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Metisilin direncinin ekspresyonunu etkileyen peptidoglikan prekürsörleri. PBP2a'nın fonksiyonel olabilmesi için peptidoglikan prekürsörlerinin pentaglisin yan zinciri ve amin bağlı glutamin ihtiva etmesi gereklidir. *femA*, *femB*, *femC* ve *femB* genlerinin inaktivasyonu prekürsörlerin dekorasyonunu engelleyerek metisilin direncinin ekspresyonunu azaltır. (Kaynak 17'den adapte edilmiştir.)

PBP2a ve regülatör proteinleri, *mec* geni tarafından sentez edilmektedir. *Mec* geni *SSCmec* adlı 21–67 kb’lık mobil genetik bölge içinde bulunmaktadır. *SSC* mobil bir genetik eleman olup stafilokok türleri arasında gen alışverişini sağlamaktadır. *S. aureus* ve bazı koagülaz-negatif stafilokoklarda tanımlanmıştır (25). *SSCmec* *SSC* ailesinin bir üyesi olup metisilin direncini taşımakla görevlidir. *Mec* geni yapısal bir komponent olan *mecA* ve genin ekspresyonunu kontrol eden iki adet regülatör komponentten oluşmaktadır: *mecR1* ve *mecI*. Bu iki gen *mecA* transkripsiyonun regülasyonunu sağlar. Beta-laktamaz genleri olan *blaI*, *blaRI*, *blaZ*, *mecR1-mecI* genleri ile sekans benzerliği gösterdiklerinden *mecA* gen transkripsiyonunun down-regülasyonunu kontrol eder (26). *SSCmec* elementi metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) genomuna bölge-özümlü şekilde integre olarak bakteriyi MRSA haline dönüştürmektedir (27). *Mec* geni metisiline duyarlı suşlarda bulunmaz, dirençli tüm suşlarda bulunur (28). *MecA* geni tarafından bakterinin metisiline direnç kazanması tüm β laktam antibiyotiklere karşı çapraz dirence neden olmaktadır. β laktam direncine ek olarak transpozon ve plazmidlerin de *SSCmec* elementine integre olması sonucu diğer direnç genleri de kazanılmaktadır. Bunlar arasında eritromisin, spektinomisin, tetrasiklin, kanamisin gibi direnç genleri sayılabilir.

2.2. Metisilin Direncinin Ekspresyonu

Tüm MRSA’larda *mec* geni bulunmasına rağmen metisilin direncinin fenotipik ifadesi farklılık gösterebilmektedir. Bir başka deyişle metisilin direnci heterojen bir yapıya sahiptir. Bunun nedeni bir MRSA suşunun 37°C’lik normal inkübasyon sıcaklığında ve pH’nın 7.0 olduğu koşullarda bile az bir kısmının (1 colony forming unit (cfu) /10⁴-10⁷ cfu) dirençli bulunabilmesidir (29). İnkübasyon ısı ve süresi, inokulasyon miktarı metisilin direncinin saptanmasında önemli etkileri olan faktörlerdir. Ayrıca duyarlılık testinde kullanılan besiyeri, besiyerinin pH’sı ve tuz içeriği sonucu etkileyebilecek diğer faktörlerdir. İnkübasyon sıcaklığı 30–35°C’ye indirilir veya üreme ortamına %2-4’lük sodyum klorür eklenirse daha homojen bir direnç ekspresyonu gözlenir (30). Ayrıca heterojen suşların bulunduğu ortamda β laktam varlığında büyüme, homojen fenotipin seleksiyonu ile sonuçlanır. Bu hücrelerin antibiyotiksiz ortamda seri olarak pasajlanması ile yavaş olarak

heterojen duruma geri dönüş gözlenir. *Fem* genleri de metisilin direncinin homojen ekspresyonu için gereklidir. Bu yardımcı genler peptidoglikan sentezinin farklı basamaklarında işlev görürler. *Fem* genlerinin inaktivasyonu homojen olarak dirençli bir suşu heterojen dirençli hale getirebilmektedir (24).

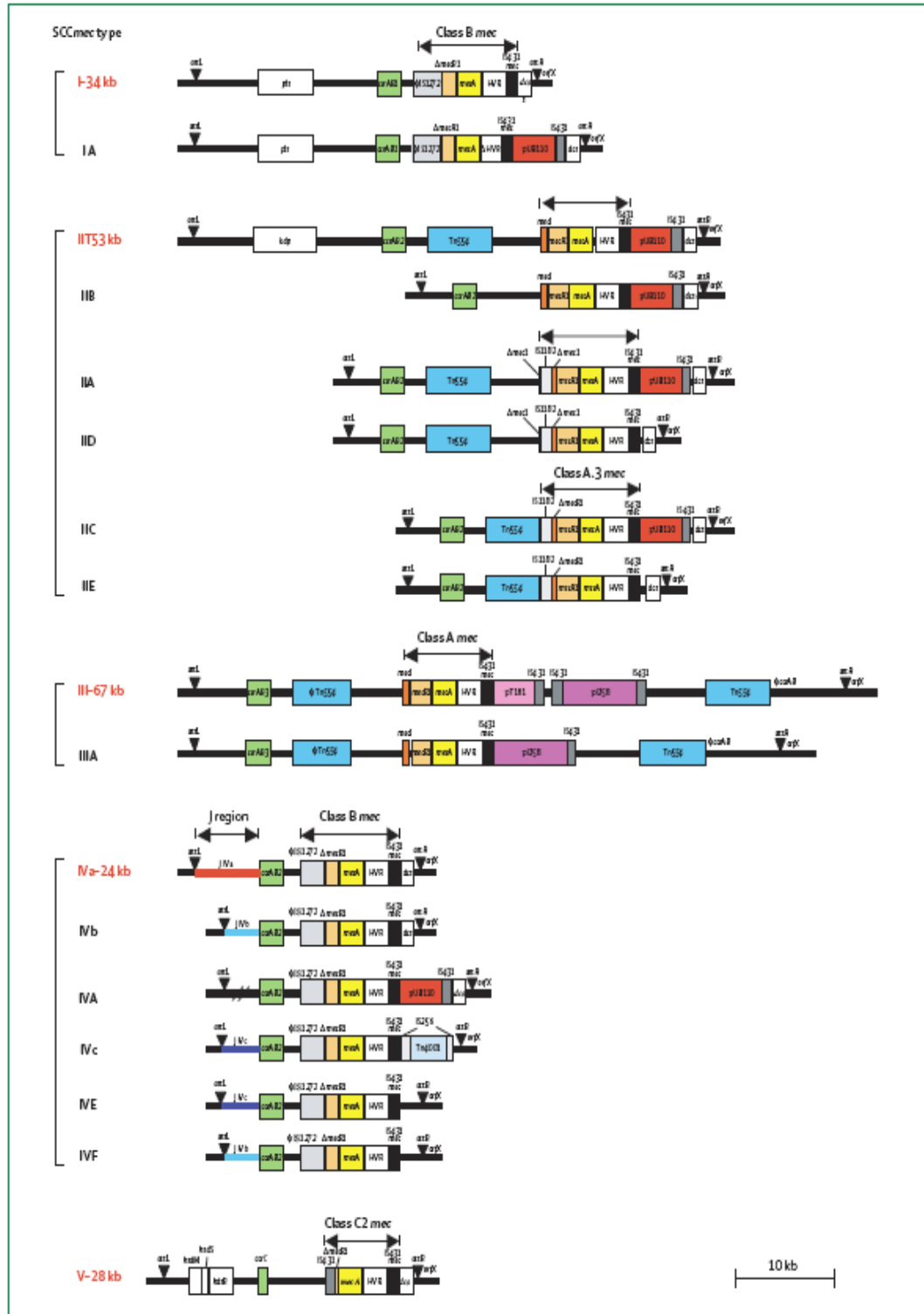
Birçok laboratuvar metisilin direncini saptamak için metisilin yerine daha stabil bir molekül olan oksasilin kullanmayı tercih etmektedir. Yüksek derecede heterojen bakteri gruplarında otomatik sistemler yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Günümüzde metisilin direncini belirlemede en duyarlı yöntem DNA hibridizasyon ya da daha sık olarak kullanılan PZR yöntemi ile *mecA* geninin varlığının saptanmasıdır (5,31,81).

SCC*mec* *S. aureus*'ta bulunan bir genomik adadır. SCC*mec* elementi içinde *mec* gen kompleksi, *ccr* gen kompleksi ve "junkyard (J) bölge" denilen ve önemsiz genleri içerdiği düşünülen bölge yer alır. *Ccr* gen kompleksi SCC*mec* elementinin mobilizasyonunu sağlayan bölge-özümlü rekombinazların kodlanmasında görev alır (32). PZR yöntemi ile *mec* gen kompleksi içerdiği genetik yapının farklılığına göre beş sınıfa ayrılmıştır; sınıf A, sınıf B, sınıf C, sınıf D ve sınıf E (6,32,33). *Ccr* gen kompleksi *ccrA* ve *ccrB* olmak üzere 2 adet bölge-özümlü rekombinaz geni içermektedir (32,34). *CcrA* ve *ccrB*'nin dörder adet allotipleri bulunmaktadır: *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, *ccrA4* ve *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4*. SCC*mec*, kendisini oluşturan *mec* gen kompleks sınıfları ve *ccr* gen kompleks tiplerinin, çeşitli kombinasyonlar şeklinde biraraya gelmesi ile farklı tiplere ayrılmaktadır (SCC*mec* tip I, II, III,IV,V) (Tablo 2.1). Ayrıca J bölgesindeki yapısal farklılığa bağlı olarak her bir SCC*mec* tipinin varyantları tanımlanmıştır: IA, IIA; IIB, IIC, IID, IIE, IIIA, IIIB, IVa, IVb, IVc, IVd, IVA, IVE, IVF (35,36) (Şekil 2.3).

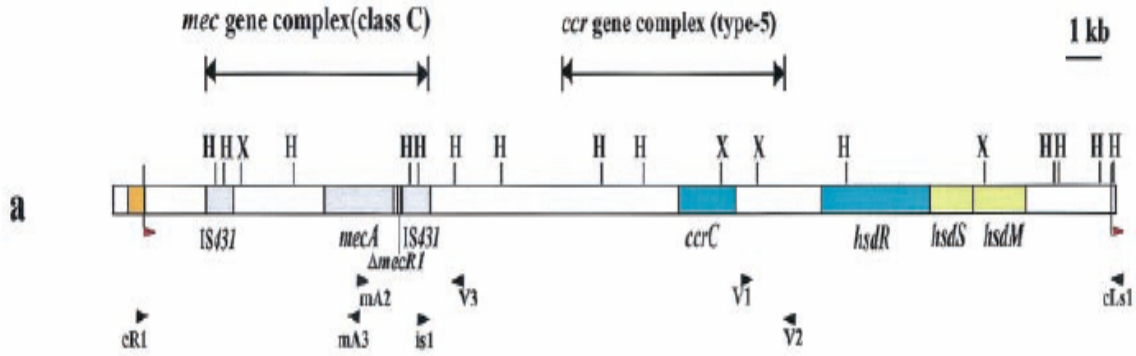
Tablo 2.1. MRSA’da SCCmec Tipleri ve İçerikleri

SCCmec Tipi	mec Gen Kompleksi	ccr Gen Kompleksi
Tip I SCCmec	Sınıf B	Allotip 1
Tip II SCCmec	Sınıf A	Allotip 2
Tip III SCCmec	Sınıf A	Allotip 3
Tip IV SCCmec	Sınıf B	Allotip 2
Tip V SCCmec	Sınıf C	ccrC

PZR yöntemi ile yapılan çalışmalarda birçok MRSA suşunun 5 SCCmec tipinden (SCCmec tip I, II, III,IV,V) birini taşıdığı ve bunların birbirlerinden genetik içerik ve büyüklük bakımından farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (8,37). Hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) klonlarının çoğunluğu tip I, II veya III SCCmec taşırken TK-MRSA suşları çoğunlukla tip IV SCCmec taşımaktadır (38,39). Tip V SCCmec ilk kez 2004 yılında, Avustralya’da izole edilmiş TK-MRSA suşunda tanımlanmıştır (WIS suşu). Yeni elementin sınıf C mec gen kompleksi ile daha önce tanımlanmamış ccr gen kompleksi taşıdığı gösterilmiştir. Bu yeni ccr gen kompleksi ccrC olarak adlandırılmıştır (Tablo 2.1). Tip V SCCmec, 28 kb’lık küçük bir element olup mecA dışında direnç geni taşımamaktadır (Şekil 2.4). Ancak diğer SCCmec tiplerinden farklı olarak elementin kromozomda stabilizasyonunu sağladığı düşünülen birtakım yabancı genler içermektedir (37).



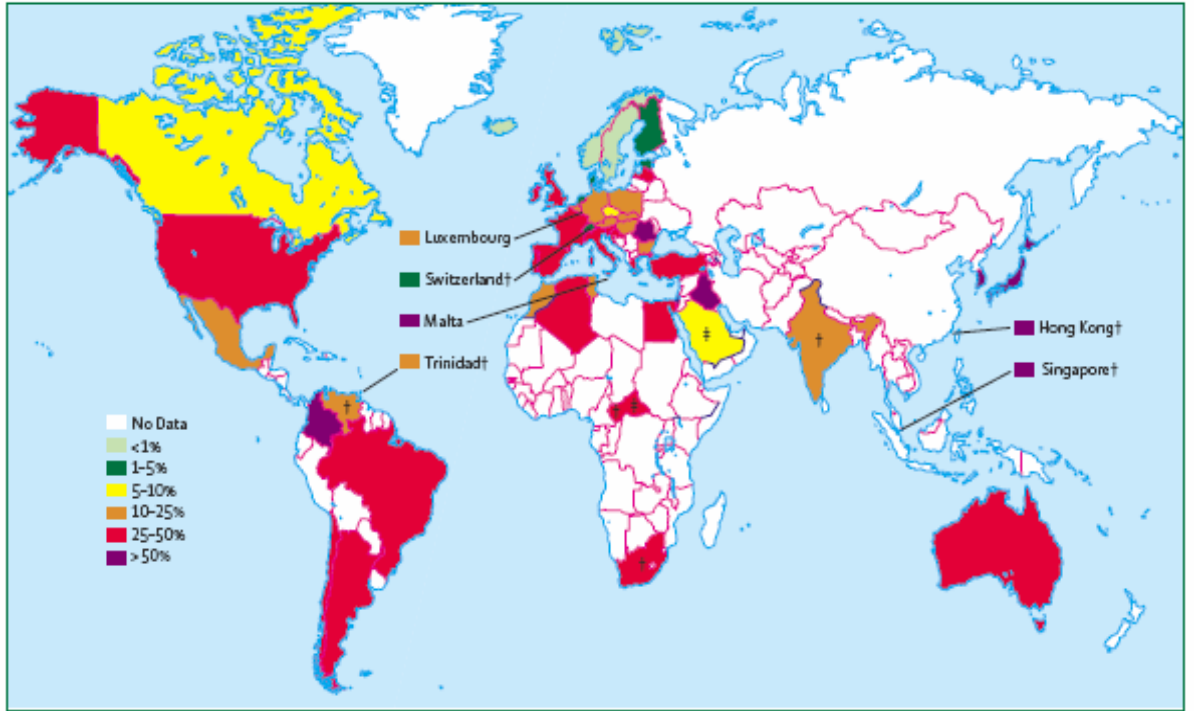
Şekil 2.3. SCCmec tip I-V ve varyantlarının genomik organizasyonunu gösteren şematik diyagram. (Kaynak 35’den alınmıştır.)



Şekil 2.4. WIS suşuna ait tip V SCC_{mec} elementinin genetik yapısı (Kaynak 37'den basitleştirilerek alınmıştır.)

2.3. MRSA Epidemiyolojisi

MRSA ilk kez 1961 yılında Birleşik Krallık'ta ilk semisentetik anti-stafilokokal penisilinaz dirençli penisilin olan metisilin'in bulunuşundan kısa bir süre sonra tanımlanmış, 1960'larda Avrupa'daki birçok ülkede ve ABD'de izole edilmiştir. Bu yıllarda izole edilen suşların çoğu tek bir MRSA klonundan köken almaktaydı. Fakat o yıllarda prevalans düşük olup sadece sporadik salgınlar rapor edilmekteydi (40). 1980'lerden itibaren MRSA prevalansında hızlı bir artış saptanmış, birçok epidemik suş ile hastane salgınları rapor edilmeye başlanmıştır (41). Günümüzde dünyanın birçok bölgesinde bulaşma özelliği yüksek klonların sebep olduğu epidemiler neticesinde MRSA görülme sıklığı giderek artış göstermektedir. MRSA prevalansındaki bu hızlı artışın nedeni tam olarak anlaşılammışsa da bazı faktörlerin rol oynadığı düşünülebilir. Bunlar arasında gereksiz ve/veya uygunsuz antibiyotik kullanımı, infeksiyon kontrol tedbirlerinin yetersiz olması, MRSA suşlarının mutasyon ile ya da direnç genleri yoluyla antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi sayılabilir. İlginç olan, yıllar içinde *S. aureus*'a bağlı infeksiyon toplam prevalansının değişmemesine karşın MRSA'nın etken olduğu infeksiyon oranının tüm *S. aureus* izolatları arasında artış göstermesidir. Farklı ülkelerde MRSA prevalansı önemli farklılıklar göstermektedir. Prevalans ABD, Japonya ve Güney Avrupa'da yüksek, İskandinavya'da ise çok düşüktür (35,42) (Şekil 2.5). Hatta aynı ülke içindeki hastanelerde farklı prevalanslara rastlamak mümkündür. Farklı hastanelerde MRSA infeksiyon oranı %50'ye ulaşmakta ve bu durum yüksek bir ekonomik yüke neden olmaktadır (2).



Şekil 2.5. Dünyada ülkeler bazında MRSA prevalansı. (Kaynak 35'den alınmıştır.)

İlk tanımlandıkları 1961 yılından itibaren MRSA suşları nozokomiyal bulaş ile ilişkilendirilmişlerdir. Hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında birçok antibiyotiğin rutin olarak verilmesi dirençli fenotiplerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Hastanın MRSA ile kolonize/infekte olmasında birtakım risk faktörleri rol oynamaktadır. Bunlar arasında hastanede yatış süresinin uzaması (>14 gün), yoğun bakım veya yanık ünitesinde bulunma, invaziv veya cerrahi işlemler, damar içi ilaç kullanımı ve uzun süre antibiyotiğe maruz kalma sayılabilir. Hastalar ve sağlık kurumu çalışanları MRSA ile kolonize olabilir ve bulaş kaynağı haline gelebilirler. Yatan hastalarda kolonizasyon oranı %0.2–7.2 arasında rapor edilmektedir (43,44). MRSA'nın en sık kolonize olduğu vücut bölgesi nazal bölgedir. Perine, eller, umblikus, aksilla, cerrahi yaralar, dekübit ülserler, boğaz, idrar ve intravasküler kateterler MRSA'nın kolonize olabileceği diğer bölgelerdir. MRSA'nın önemli problem oluşturduğu sağlık kuruluşlarında çalışanların nazal taşıyıcılık oranı ortalama %3–5 civarındadır (45). Birçok taşıyıcıda kolonizasyon kısa süreli olduğundan bu kişiler önemli bir rezervuar olarak görülmemelidir. Ancak az sayıda

taşıyıcı uzun süre kolonize kalmaktadır ki bunlar MRSA için önemli rezervuarlar olarak kabul edilmektedir.

Hastanede yatan hastalardan MRSA ile kolonize olanların %30-60'ı MRSA infeksiyonu geliştirmektedir (46). Kolonizasyondan infeksiyona ilerlemeye katkıda bulunan konak faktörleri arasında yakın zamanda hastanede yatış öyküsü, cerrahi operasyon, yara debridmanı ve diğer invaziv işlemler sayılabilir. MRSA infeksiyonu vücutta sıklıkla yara yerleri, cilt, dolaşım sistemi, alt solunum yolu ve üriner sistemi tutmaktadır.

MRSA'nın bir hastadan diğerine bulaşı sıklıkla sağlık çalışanı tarafından kontamine eller veya eldivenler yoluyla olmaktadır. Ayrıca kronik nazal taşıyıcılar tarafından damlacık yoluyla bulaş da sık görülmektedir. Turnike, stetoskop, tansiyon ölçüm aletleri gibi tıbbi gereçlerin de bulaşa neden olabileceği öne sürülmüşse de bu konuda yeterli bilgi yoktur.

MRSA'ya bağlı infeksiyonların kontrol edilmesinde en önemli basamak MRSA suşlarının tiplendirilmesidir. Bu şekilde epidemiyolojik olarak izolatlar arasında genetik ilişki varlığının saptanması sağlanabilmektedir. Ayrıca tiplendirme verileri epidemik, endemik veya sporadik suşların ayırımında oldukça önemlidir. Tiplendirme amacıyla kullanılan fenotipik tiplendirme yöntemleri (biyotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, serotiplendirme, vb.) günümüzde yerini DNA'ya dayalı genotipik yöntemlere bırakmıştır. Genotipik yöntemler içinde en önemlileri ve sıklıkla kullanılanları pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve PZR'dir. Ancak hiçbir tiplendirme yöntemi tek başına ideal değildir. Bu nedenle MRSA izolatlarının ilişkilendirilmesinde tiplendirme metodlarının kombine edilerek kullanılması daha kesin bilgiler vermektedir (47,48,49,50).

Toplumda kazanılmış *S. aureus* infeksiyonlarında etken çoğunlukla MSSA suşlarıdır. MRSA toplumda çok daha nadir görülmektedir. MRSA'nın toplumda saptandığı hastalarda yapılan detaylı incelemelerle hemen her zaman MRSA kazanımı için predispozan risk faktörleri saptanabilmiştir (51,52). Ancak son yıllarda MRSA infeksiyonu için geleneksel risk faktörleri taşıyan ya da taşımayan hastalarda toplum kökenli MRSA infeksiyonları saptanmaya başlamıştır. Bu durum MRSA epidemiyolojisinin yeniden gözden geçirilmesine ve TK-MRSA kavramının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

2.4. TK-MRSA

Toplumda kazanılmış ilk MRSA infeksiyonu vakaları 1980’li yıllardan itibaren bildirilmeye başlanmıştır. Bu vakaları intravenöz ilaç kullananlar, uzun dönem bakım merkezlerinde kalmış olanlar, kronik hastalığı olanlar ve sağlık merkezleri ile sık temasta bulunanlar oluşturmaktaydı (53). Son 10 yıl içerisinde MRSA infeksiyonu için herhangi bir risk faktörü taşımayan sağlıklı bireyler arasında toplumda ortaya çıkmış MRSA infeksiyonları bildirilmeye başlandı. Bu infeksiyonların sıklığı ve görüldüğü coğrafik yerler giderek artış gösterdi. Bu infeksiyonlar “toplumda kazanılmış MRSA infeksiyonu” şeklinde nitelendirildi ve neden olan suşun genetik geçmişi, epidemiyoloji, klinik spektrum ve antibakteriyel direnç yönünden HK-MRSA suşlarından tamamıyla farklı özellikler taşıdığı ortaya çıkarıldı (54,55,56,57,58).

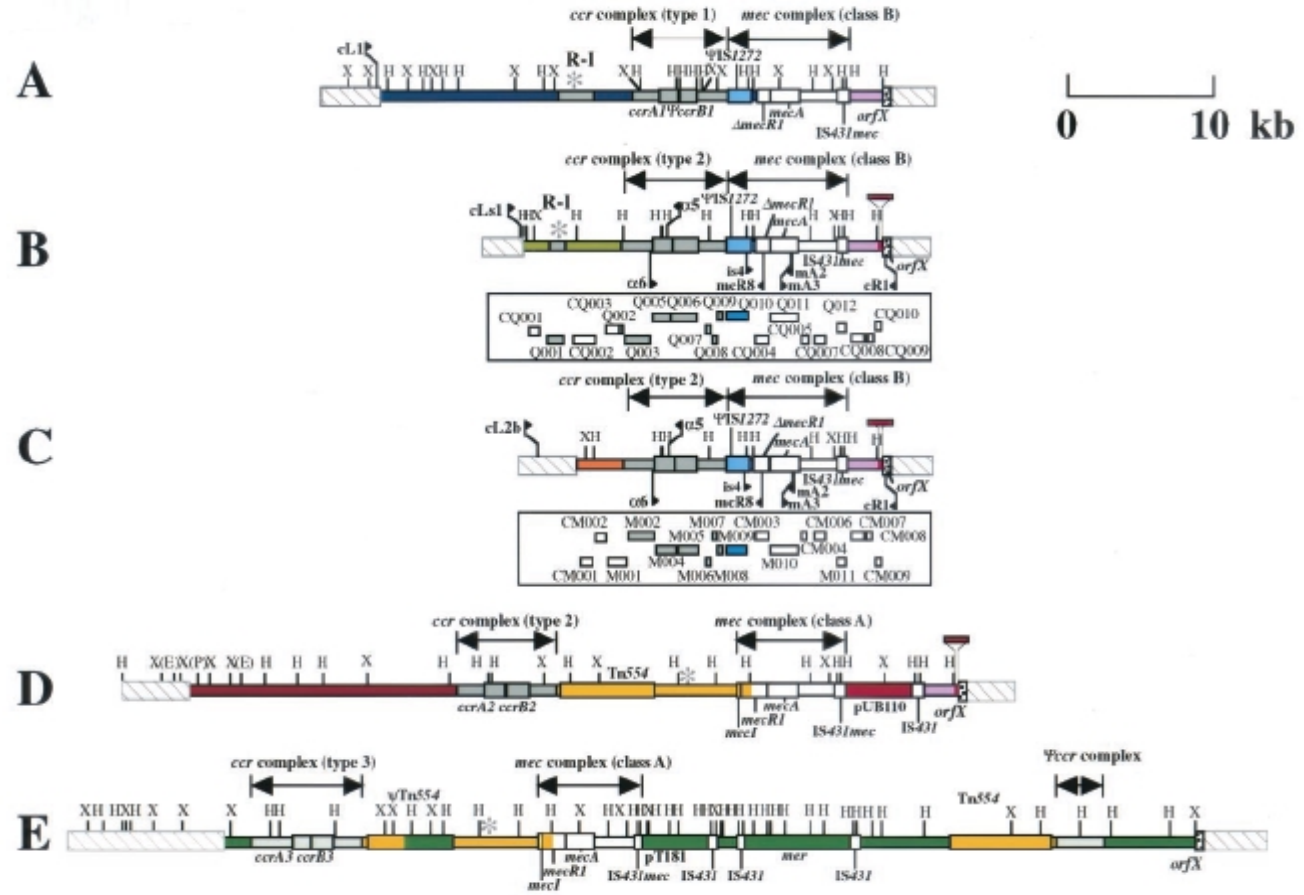
TK-MRSA’nın tanımında birtakım belirsizlikler bulunmaktadır. Bu durum infeksiyonun başlangıç ya da görülme zamanı ile MRSA’nın birey tarafından kazanım yeri ve zamanının farklı olabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı çalışmalarda; hastaneye yatıştan sonraki 48–72 saat içinde MRSA infeksiyonu saptanması durumunda mikroorganizmanın hastane ortamına hasta tarafından toplumdan kazanılarak getirildiği kabul edilmekte ve toplumda kazanılmış MRSA şeklinde sınıflandırılmaktadır (59). MRSA kazanımı dinamik bir süreç olduğu için belirli bir suşun nerede kazanıldığını kesin olarak saptamak oldukça güçtür. Örneğin daha önce belli bir süre hastanede yatmış bir hasta ile toplum içinde temasa geçmiş bir bireyde HK-MRSA suşu kolaylıkla saptanabilmektedir. Aynı şekilde toplum kaynaklı bir MRSA suşunun hastane ortamında postpartum kadınlar arasında salgına yol açtığı rapor edilmiştir (60). Bu nedenle MRSA’yı HK-MRSA ve TK-MRSA olarak ikiye ayırmak gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda HK-MRSA sağlık kuruluşu içinde saptanan suşları tanımlamaktadır ve hastaya bulaş için yukarıda sayılan birtakım risk faktörleri predispozan rol oynamaktadır. TK-MRSA nozokomiyal infeksiyon için predispozan faktörler taşıyan ya da taşımayan hastalar arasında toplumda saptanmış suşları ifade etmektedir. Bu durumda TK-MRSA iki gruba ayrılabilir; risk faktörü taşımayan hastaları infekte eden suşlar (risk faktörü olmadan TK-MRSA) ve risk faktörü taşıyan hastaları infekte eden suşlar (risk

faktörü ile birlikte TK-MRSA) (60). İnfeksiyon Hastalıkları Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Infectious Disease Control and Prevention, CDC)'nin 2005 yılı Şubat ayında TK-MRSA infeksiyonu için yaptığı tanımlama şöyledir: “Hastane dışında ya da hastaneye yatış sonrası 48 saat içinde infeksiyon belirti ve bulguları taşıdığı saptanan; daha önce MRSA infeksiyonu ya da kolonizasyonu öyküsü olmayan, geçen bir yıl içinde herhangi bir hastane ya da sağlık kuruluşuna başvuru öyküsü olmayan, diyaliz, cerrahi, kalıcı kateter, deriden geçerek vücuda ulaşan herhangi bir medikal cihaz uygulanma öyküsü olmayan bir hastada MRSA varlığının gösterilmesi”.

2.5. TK-MRSA'nın Moleküler Özellikleri

TK-MRSA taraması amacıyla 1998 yılında Dallas ve Texas'taki iki farklı günlük bakım merkezindeki çocuklar incelenmiş, çocuklarda sırasıyla %3 ve %24 oranında MRSA kolonizasyonu saptanmıştır (61). Saptanan izolatlar genel olarak antibiyotiklere duyarlı olup çoklu antibiyotik direnci gösteren HK-MRSA suşlarından farklıydılar. Üstelik kolonize olmuş çocukların %40'nın geçmiş 2 yıl içinde herhangi bir sağlık kuruluşu ya da personeli ile temas etmediği saptanmıştı. Bu; toplum içinde çocuklar arasında süregelmekte olan bir MRSA geçişi ve kolonizasyonunun varlığını göstermesi bakımından önemli bir çalışmadır. Şikago'da yapılan bir çalışmada MRSA infeksiyonu ile hastaneye başvuran ve kolonizasyon için herhangi bir risk faktörü taşımayan çocuk hasta sayısında 25 kat artış olduğu ortaya konmuştur (62). Buradan elde edilen MRSA suşlarının da toplumda kazanılmış ve bir hastadan diğerine bulaşmış olup, antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. 1999'da Minnesota ve Kuzey Dakota bölgesinde dört çocuğun MRSA infeksiyonu nedeniyle ölmesi ulusal ve uluslararası sağlık örgütlerini alarma geçirmiştir (63). Burada ölen çocuklar da tıpkı Şikago çalışmasındaki gibi MRSA infeksiyonu için risk taşımayan hastalardı. İnfeksiyona sebep olan suşlar beta laktamlar dışındaki antibiyotiklere duyarlı idi. Ölen çocuklardan izole edilen MRSA, MW2 suşu olarak isimlendirildi ve TK-MRSA'nın prototipi olarak kabul edildi. Bu prototipin taşıdığı tüm genom 2002 yılında sekanslanmıştır (7). İlk kez 2001 yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada 2 adet TK-MRSA suşunun tüm nükleotid sekansları tanımlanmıştır. Suşlar septik artrit ve osteomyeliti olan bir hastanın eklem

sıvısından (suş CA05) ve diğere bir hastanın perine bölgesinden (suş 8/6-3P) izole edilmiştir (39). DNA'nın sekanslanması sonucu suşların HK-MRSA suşlarından farklı bir *mecA* ve rekombinaz genleri (*ccr*) taşıdığı saptanmıştır. Bu farklı kombinasyonla ilk kez karşılaşılmış olup SCC*mec* IV olarak adlandırılmıştır. Her iki suşun genomik yapısı aynı özellikleri taşımakla birlikte *ccr* genlerinin sol ucundaki bölge (L-C bölgesi) farklılık taşımaktadır. Bu bölgedeki farklılığa dayanarak subtip IVa (suş CA05) ve subtip IVb (suş 8/6-3P) olarak adlandırılmışlardır (Şekil 2.6). SCC*mec* IV, *mecA* dışında başka bir direnç geni taşımadığından boyut olarak diğere SCC*mec* elementlerinden küçüktür. Diğere SCC*mec* elementleri hastane kökenli suşlarda bulunmakta olup, oldukça büyük ve fonksiyonel rekombinaz genlerinden yoksun olduklarından faj paketleme ve hareket etme özelliklerinden yoksundurlar. Halbuki SCC*mec* IV küçük olduğu ve fonksiyonel rekombinaz genlerine sahip olduğu için fajlar tarafından paketlenerek yeni konak genomuna bölge-özel olarak integre olabilmektedir. Bu hareket ve birleşme özelliği SCC*mec* IV'ün birçok farklı MRSA'nın genetik geçmişinde saptanmasını açıklamaktadır (38).



Şekil 2. 6. TK-MRSA suşlarından elde edilen SCCmec elementlerinin diğer üç tip SCCmec elementleri ile karşılaştırılması. (A) Tip I SCCmec. (B) Tip IV SCCmec (suş CA05-subtipa). (C) Tip IV SCCmec (suş 8/6-3P-subtipb). (D) Tip II SCCmec. (E) Tip III SCCmec. (Kaynak 26'dan basitleştirilerek alınmıştır.)

Birçok merkez tarafından çeşitli bölgelerden elde edilmiş TK-MRSA suşlarının genotiplendirmesi yapılmaktadır. Genotiplendirme metodları içinde PFGE ve protein A geninin polimorfik tekrar bölgesinin DNA sekans analizi (*spa* typing) en çok kullanılanlardır. PFGE ve *spa* typing çalışmaları ile TK-MRSA suşları iki ana gruba ayrılabilir: ilk grup mono-beta laktam dirençli ya da beta laktam ve eritromisin dirençli olup MRSA kazanımı için herhangi bir predispozan faktör taşımayan sağlıklı bireyleri infekte etmektedir. MW2 suşu bu grubun prototipidir. Klindamisin ve florokinolonlara duyarlılık göstermesi bu grubu HK-MRSA'dan ayırmaktadır (60, 64). İkinci grup MRSA kazanımı için risk faktörü taşıyan toplumdaki bireylerden izole edilmiş MRSA suşlarını içermektedir. Bu grubun duyarlılık profili daha düşük olup klindamisin ve florokinolonlara dirençlidirler. MW2'den genetik geçmişleri ile ayrılan bu grup sağlık kuruluşlarında sıkça izole edilmektedir ve “archaic” ya da “historic” MRSA klonu şeklinde anılmaktadır (65).

2.6. TK-MRSA'nın Virulans Faktörleri

TK-MRSA'nın virulansı sadece β laktam direnci tarafından oluşturulmamaktadır. 1999 yılında prototip MW2 suşuna bağlı çocuk ölümleri bu klonun hipervirulan olduğunu göstermiştir. Bu prototipin tüm genlerinin sekanslanmasıyla diğer *S. aureus* suşlarında olmayan bazı virulans faktörlerinin olduğu görülmüştür (7,66). Bu virulans faktörlerini oluşturan 19 adet gen bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri PVL ve stafilokokal enterotoksin C ve H (*sec*, *seh*) genleridir (Tablo 2.2). PVL esas olarak *lukS*-PV ve *lukF*-PV genleri tarafından kodlanmaktadır (67). *LukS*-PV ve *lukF*-PV genleri Avrupa ve ABD'deki hemen tüm TK-MRSA suşlarında bulunmaktadır. Diğer virulans genleri orijin aldıkları kıtaya göre farklılık göstermektedir. Dünyadaki birçok bölgeden elde edilen toplam 117 TK-MRSA suşu üzerinde yapılan bir çalışmada tüm Avrupa ve Amerika suşlarında başka bir lökosidin kodlayan *lukE-lukD* geni ve γ -hemolizin varyant (*hlg-v*) geni saptanmıştır (56,57). Okyanusya kaynaklı suşların ise γ -hemolizin geni (*hlg*) taşıdığı görülmüştür. 2003 yılında New York şehir hastanesinde prototip MW2 suşu postpartum kadınlar arasında salgına yol açmış ve şiddetli mastit vakalarına neden olmuştur (68). Bu salgındaki tüm MRSA suşlarında PVL ve *seh* genleri saptanmış, *sec* geni ürünü olan stafilokokal enterotoksin C (SEC) proteini ürettikleri

görülmüştür. Eldeki kanıtlar göstermektedir ki her bir suşun patojenik potansiyeli değişik virulans genlerinin değişik suşlar arasında horizontal geçişi ile belirlenmektedir.

PVL ilk kez 1932 yılında tanımlanmış, lökositleri tahrip eden ve doku nekrozuna yol açan bir toksindir (9). Sağlıklı çocuk ve genç erişkinlerde deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve ciddi nekrotizan pnömoni ile ilişkili bulunmuştur. Klinik olarak TK-MRSA suşları deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu tür infeksiyonlarda virulans faktörlerine yönelik yapılan PZR analizlerinde etken suşlarda PVL ve *seh* genlerine rastlanmış, SEC proteini ürettikleri saptanmıştır. Sonraki çalışmalarda ise deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına yol açan tüm suşların *seh* ya da *sec* geni taşımadıkları fakat hepsinde ortak olarak PVL geni bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulgu deri ve yumuşak doku infeksiyonlarında klinik prezentasyonu asıl belirleyen faktörün PVL geni olduğunu ortaya koymaktadır.

2.7. Epidemiyoloji

Sağlık kuruluşları ile temas olmadığı durumlarda MRSA kolonizasyonu oldukça nadir görülmektedir (69,70). Yakın zamanda yapılmış bir meta analizde toplumda MRSA kolonizasyon prevalansı %1.3 bulunmuştur. Meta analizi oluşturan çalışmalardaki hastalardan sağlık kuruluşu ile temas edenler çıkarıldığında ise prevalans %0.2'ye düşmektedir (53). Fakat ABD'de yapılan çalışmalarda son 10 yıl içinde TK-MRSA klinik izolatlarında mutlak bir artış saptanmıştır (55,71).

TK-MRSA ve HK-MRSA arasındaki en önemli epidemiyolojik farklılık TK-MRSA'nın daha çok pediatrik ve genç erişkin hastalarda; HK-MRSA'nın ise yaşlı hasta grubunda infeksiyon etkeni olmasıdır. TK-MRSA infeksiyonu düşük gelir düzeyli ailelerde ve azınlıklarda daha sık görülmektedir (54). Ayrıca MSSA ile karşılaştırıldığında klinik infeksiyon/kolonizasyon oranı TK-MRSA'da daha yüksektir. Bunun nedeni olarak TK-MRSA'da virulan PVL genlerinin yüksek taşınma oranı gösterilmektedir (57,67).

Tablo 2.2. Toplum kökenli *S.aureus*'un virülans faktörleri

Virulans faktörü	Özellik	Klinik sendrom
Direnç Belirleyici Faktör		
SCC _{mec} Tip IV	Metisilin Direnci	
SCC ₄₇₆	Fusidik asit direnci	
Aderens		
Kollajen-adezin protein (CNA)	Konak dokularına daha etkin aderens	EF, NP, artirit, osteomyelit
Kolonizasyon		
Bakteriosin	Tür içi ve türler arası rekabet	EF
Bilinmeyen	Tuza daha etkin tolerans	EF
Süperantijenler		
Enterotoksinler	T hücre aktivasyonu	EF, NP, TSS benzeri hastalık
Stafilokokal enterotoksin A		
Stafilokokal enterotoksin B		
Stafilokokal enterotoksin C		
Stafilokokal enterotoksin G		
Stafilokokal enterotoksin H	Oldukça güçlü süperantijen	
Stafilokokal enterotoksin K		
Stafilokokal enterotoksin L		
Stafilokokal enterotoksin O		
Ekzotoksinler		
Stafilokokal ekzotoksin T	İmmüniteye karşı olası defans	
Por oluşturuvcu toksinler		
PVL (<i>LukSPV+LukFPV</i>)	Nekroz, ödem	EF, NP
<i>LukE+LukD</i>	Barsak mikrovilluslarında destrüksiyon	Antibiyotik sonrası diyare
<i>LukEv+LukDv</i>	Nekroz	EF
A-Hemolizin	Nekroz, vasküler kaçış, şok	EF, NP, büllöz impetigo
Eksfoliyatif toksinler		
Eksfoliyatif toksin A		
Eksfoliyatif toksin B		

Açıklamalar: EF: epidemik fronkülozis, NP: nekrotizan pnömoni, TSS: toksik şok sendromu (Kaynak 93'den sadeleştirilerek alınmıştır.)

TK-MRSA infeksiyonu kişiden kişiye bulaşabilmektedir. Aile içi bulaş sonrası infeksiyonlar ve salgınlar bildirilmektedir. Çocuk bakım merkezleri, çocuklar arası yakın temas nedeniyle TK-MRSA'nın toplumda yayılımı için rezervuar görevi görebilmektedir. Bu merkezlerde kolonizasyon prevalansı %0.6–23 arasında bulunmuştur (61,72). Yakın fiziksel temas gerektiren ve kişisel hijyenin kötü olduğu grup çalışmaları ve aktiviteler TK-MRSA'nın toplum içinde yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Askerler, mahkumlar, çocuk bakım merkezlerindeki çocuklar ve homoseksüel erkekler arasında TK-MRSA'ya bağlı deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının neden olduğu salgınlar bildirilmektedir. Besin kaynakları diğer bir bulaş yolu olarak öne sürülmektedir. Yakın zamanda TK-MRSA'ya bağlı gastroenterit salgını bildirilmiş ve salgına neden olan yiyecekte ve hastalardan SEC üreten suş izole edilmiştir (73).

TK-MRSA'nın nozokomiyal transmisyonu ve nozokomiyal salgınlara yol açması TK-MRSA epidemiyolojisini oldukça ilgi çekici bir hale taşımıştır. Bildirilen salgınlar yenidoğan ya da postpartum kadınlar arasında meydana gelmiştir (68, 74,75). Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde hospitalize edilen yenidoğanlar gelişimsel immüsupresyon, altta yatan hastalıklar ve vücut bariyerlerinin tıbbi cihazlar ile bozulmuş olması nedeniyle ciddi infeksiyonlar için yüksek risk altındadırlar. Hastane içinde TK-MRSA yayılımını kolaylaştıran faktörler arasında; toplum içinden gelen ve daha önce taşıyıcılığı tespit edilmemiş TK-MRSA taşıyıcılarının hastane içine girmesi, uzamış asemptomatik kolonizasyon, yetersiz laboratuvar tespiti ve bildirim, el hijyenine ve temas kurallarına uyulmaması önemli yer tutmaktadır.

2.8. TK-MRSA'ya Bağlı İnfeksiyonlar ve Klinik Özellikleri

TK-MRSA hafif deri infeksiyonlarından ölümcül pnömoni ve sepsise uzanan birçok infeksiyona yol açmaktadır. Toplum kaynaklı çalışmalar TK-MRSA infeksiyonlarının çoğunlukla deri ve yumuşak dokuya lokalize olduğunu göstermektedir. TK-MRSA ve HK-MRSA infeksiyonları klinik olarak birbirinden oldukça farklı klinik özellikler göstermektedirler. HK-MRSA infeksiyonları diğerine nazaran daha invaziv olma eğilimindedir.

TK-MRSA'ya bağlı deri ve yumuşak doku infeksiyonları arasında fronköl, abse, folikölit, impetigo ve selölit sayılabilir. İnfeksiyon çoğunlukla alt ya da üst ekstremitelerde lokalizedir, fakat diğer bölgelerde de bulunabilir. Vücudun bir bölgesinden diğerine kendi kendine inokulasyon görölabilir. Bunların dışında hastalarda TK-MRSA ile ilişkili osteomyelit, artirit, bursit, sinüzit, orbital selölit, lenfadenit, konjonktivit, endokardit, idrar yolu infeksiyonu, kolesistit ve akut gastroenterit saptanabilir. Yakın zamanda PVL genleri taşıyan TK-MRSA suşlarına bağlı ciddi nekrotizan pnömoni ve sepsis vakalarının bildirilmiş olması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Pnömoni ile birlikte ampiyem, osteomyelit, septik artrit, deri ve kardiyovasküler tutulum birlikte olabilmektedir. Uzamış bakteremi, lökopeni, trombositopeni ve koagölopati sıklıkla infeksiyonlara eşlik etmektedir (76,77,78). PVL üreten TK-MRSA'ya bağlı invaziv infeksiyonlarda ölüm oranı %35'e ulaşmaktadır (77,78,79). Uygun antibiyotik seğiminde ve verilmesinde gecikme, eř zamanlı influenza virus infeksiyonu varlığı klinik gidişat üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 1 Ocak 2004–30 Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde yatan, hastaneye yatıştan 72 saat sonra infeksiyon klinik belirti ve bulguları gösteren hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden (pü, kan, derin trakeal aspirasyon, kateter, beyin-omurilik sıvısı, idrar, bronkoalveolar lavaj sıvısı, balgam, eklem sıvısı) izole edilen MRSA suşları çalışmaya dahil edildi. Her hastadan tek bir izolat alındı. MRSA üremesi olan hastaların yatış tarihleri, yattıkları klinik, klinik örneğin alındığı yer ve tarih kayıtlardan incelendi.

3.1. *S. aureus* İdentifikasyonu

İzolatların identifikasyonu Sceptor otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile yapıldı. İzolatlar çalışmaya dek stok besiyerinde (mikrobank) (Prolab Diagnostics, Kanada) -80°C'de saklandı. Çalışma öncesinde kanlı besiyerine pasajlanan izolatlar Gram boyama yöntemi, katalaz ve plazma koagülaz testleriyle incelendi. Gram pozitif boyanan, katalaz testi pozitif bulunan izolatlara tüp koagülaz testi uygulandı. Koagülaz testi için 2–3 bakteri kolonisi 0,5 ml tavşan plazması içeren tüplere ekilerek, tüpler 35°C'de inkübe edildi. Sonuçlar 2. saatte, koagülasyonun saptanmaması durumunda ise 24. saatte değerlendirildi.. Tavşan plazmasında koagülasyona neden olan suşlar *S. aureus* olarak kabul edildi.

3.2. Antibiyotik Duyarlılığı

Metisiline direnç durumunu saptamak amacıyla CLSI önerilerine uygun olarak oksasilin (1µg, Oxoid, İngiltere) diskleri kullanılarak disk difüzyon testi yapıldı. *MecA* varlığı PZR yöntemi ile belirlendi. MRSA olduğu belirlenen izolatların CLSI önerilerine uygun olarak Mueller-Hinton agar (Oxoid, İngiltere) besiyerinde standart disk difüzyon yöntemiyle eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) (1.25 µg/23.75 µg), rifampisin, gentamisin (10 µg), siprofloksasin (5 µg)'e duyarlılıkları araştırıldı. Linezolid, vankomisin ve teikoplanin için duyarlılık, Etest (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle araştırıldı. İnhibisyon zonunun antibiyotik şeritlerini kestiği noktadaki konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirildi (80).

3.3. PZR için Bakteri DNA'sının İzolasyonu

Bakteri DNA'sının izolasyonunda Ünal ve arkadaşları tarafından stafilokoklar için tanımlanmış olan hızlı lizis protokolü kullanıldı (81). 24 saatlik bakteri kültüründen tek koloni Mueller-Hinton besiyerine ekilip 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilip üst sıvı dökülüp, üstüne 1 cc TE buffer [10 mM Tris (pH:7.5) 1 mM EDTA (pH:8.0)] ekleyip vortekslenip pipetajla karıştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı. Süspansiyon tekrar 10 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilip üst sıvı atıldı. 100 µg/mL'lik lizostafinden 50 µl eklenip vorteksledikten sonra 10 dakika 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletildi. Vorteksledikten sonra üzerine 100 µg/mL'lik proteinaz K'dan 50 µl eklendi. Tekrar vortekslenip 10 dakika 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletildi. Daha sonra kaynayan suda 10 dakika kaynadıktan sonra 10 dakika mikrosantrifüjde çevrildi, üst sıvı çökeleğe dokunmadan alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve çökelek atıldı. Hazırlanan bu DNA *mecA*, PVL ve SCC genlerinin varlığının araştırılması için -20°C'de saklandı.

3.4. *mecA* Geninin Varlığının Araştırılması

PZR protokolü için amplifikasyon karışımı eppendorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı:

Distile su	29.75 µl
PZR tampon (10 x)	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP mix 2 mM	4 µl
<i>mecA1</i> (100pmol/µl)	0,5 µl
<i>mecA2</i> (100pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0,25 µl
total DNA'dan	5 µl

mecA geni için *mecA1* ve *mecA2* olmak üzere 2 adet primer kullanıldı (81). Primerlerin dizilimleri:

mecA1: 5'GTT GTA GTT GTC GGG TTT GG 3'

mecA2: 5'CCA CCC AAT TTG TCT GCC AGT TTC TCC 3'

Amplifikasyon programı;

94°C'de 4 dakika lizis ve denatürasyon,

94°C’de 30 saniye denatürasyon,
 55°C’de 30 saniye primer bağlanması: 30 döngü,
 72°C’de 2 dakika primer uzaması şeklinde ayarlandı.

30 döngü sonunda, 72°C’de 5 dakika olacak şekilde tüpler thermal cycler’a (Techne, İngiltere) yerleştirildi ve 30 döngü sonunda PZR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. 12 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl orange G ile karıştırıldı ve %2 lik 1xTAE tampon ile (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) hazırlanmış ve 5 µM etidyum bromür çözeltisi ile boyanmış jelde 100 V’da bir saat boyunca elektroforez akımında yürütüldü. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak ultraviyole (UV) ışığı (~304 nm) altında fotoğraf çekildikten sonra amplifiye edilen DNA’nın molekül ağırlığı, moleküler ağırlık standardı (Ø174 DNA size marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi. 1107 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* 27R kullanıldı (81).

3.5. PVL Genlerinin Varlığının Araştırılması

PZR protokolü için amplifikasyon karışımı eppendorf tüpünde toplam hacim 50µl olacak şekilde aşağıda verildiği gibi hazırlandı:

Distile su	29.75 µl
PZR tampon (10 x)	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP mix 2 mM	4 µl
<i>lukPV1</i> (100pmol/µl)	0,5 µl
<i>lukPV2</i> (100pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0,25 µl
total DNA’dan	5 µl

PVL genleri için *lukPV1* ve *lukPV2* olmak üzere iki adet primer kullanıldı (82). Primerlerin dizilimleri:

lukPV1: 5’ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A3’

lukPV2: 5’GCA TCA A(GC)T GTA TTG GAT AGC AAA AGC 3’

Amplifikasyon programı;

94 °C’de 4 dakika lizis ve denatürasyon,

94 °C'de 30 saniye denatürasyon,

55 °C'de 30 saniye primer bağlanması,

72 °C'de 1 dakika primer uzaması şeklinde ayarlandı. Bu üç döngü 30 siklus olarak programlandı. 30 döngü sonunda, 72°C'de 4 dakika olacak şekilde tüpler thermal cycler'a yerleştirildi ve amplifikasyon sonunda PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (82). 12 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl orange G ile karıştırıldı ve %2 lik 1xTAE tampon ile hazırlanmış ve 5 µM etidyum bromür çözeltisi ile boyanmış jelde 100 V'da bir saat boyunca elektroforez akımında yürütüldü. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~304 nm) altında fotoğraf çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, moleküler ağırlık standardı (Ø174 DNA size marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi. 937 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 49775 kullanıldı.

3.6. SCCmec Genlerinin Varlığının Araştırılması

SCCmec geninin varlığı multipleks PZR ile çalışıldı (83). Amplifikasyon karışımı eppendorf tüpünde toplam hacim 50µl olacak şekilde aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı:

Distile su	22.5 µl
PZR tampon (10 x)	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP mix 2 mM	4 µl
her bir primerden (100pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0,25 µl
total DNA'dan	5 µl

Multipleks PZR yönteminde kullanılan primer dizilimleri (83):

CIF2 F2: 5' TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G 3'

CIF2R2: 5' ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C 3'

KDP F1: 5' AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C 3'

KDP R1: 5' CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G3'

MEC1P2: 5' ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC 3'

MEC1P3: 5' GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC 3'

DCS F2: 5' CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC 3'

DCS R1: 5' CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG 3'
 RIF4 F3: 5' GTG ATT GTT CGA GAT ATG TGG 3'
 RIF4 R9: 5' CGC TTT ATC TGT ATC TAT CGC 3'
 RIF5 F10: 5' TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G 3'
 RIF5R13: 5' GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C 3'
 IS431 P4: 5' CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG 3'
 pUB110 R1: 5' GAG CCA TAA ACA CCA ATA GCC 3'
 pT181 R1 : 5' GAA GAA TGG GGA AAG CTT CAC 3'
mecA P4: 5' TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G 3'
mecA P7: 5' CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG 3'

Amplifikasyon programı;

94°C'de 4 dakika lizis ve denatürasyon,

94°C'de 30 saniye denatürasyon,

53°C'de 30 saniye primer bağlanması,

72°C'de 1 dakika primer uzaması şeklinde ayarlandı. Bu üç döngü 30 siklus

olarak programlandı. 30 döngü sonunda, 72°C'de 4 dakika olacak şekilde tüpler thermal cycler'a yerleştirildi ve amplifikasyon sonunda PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. 12 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl orange G ile karıştırıldı ve %2 lik 1xTAE tampon ile hazırlanmış ve 5 µM etidyum bromür çözeltisi ile boyanmış jelde 100 V'da bir saat boyunca elektroforez akımında yürütüldü. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~304 nm) altında fotoğraf çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, moleküler ağırlık standardı (Ø174 DNA size marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi.

SCC*mecI* için 162, 342, 495 bp,

SCC*mecIA* için 162, 342, 381, 495 bp,

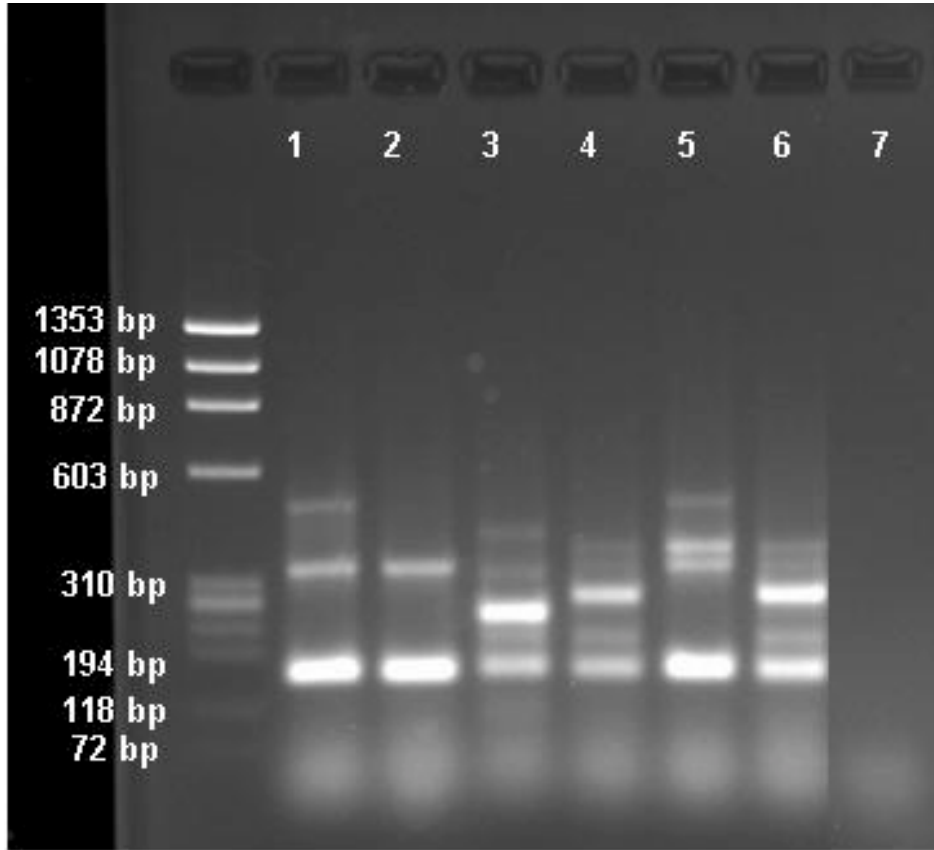
SCC*mecII* için 162, 209, 284, 342, 381 bp,

SCC*mecIII* için 162, 209, 243, 303, 414 bp,

SCC*mecIIIA* için 162, 209, 243, 414 bp,

SCC*mecIIIB* için 162, 209,

SCCmecIV için 162,342 büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (83). Pozitif kontrol olarak SCCmecI için *S. aureus* COL, SCCmecIA için *S. aureus* PER34, SCCmec II için *S. aureus* BK2464, SCCmec III için *S. aureus* ANS46, SCCmec IIIA için *S.aureus* HU25, SCCmec IV için *S. aureus* HDE288 kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Multipleks PZR yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirmesinde pozitif kontrol olarak kullanılan standart suşlar: SCCmecI için 162, 342, 495 bp (1), SCCmecIA için 162, 342, 381, 495 bp (5), SCCmecII için 162, 209, 284, 342, 381 bp (4), SCCmecIII için 162, 209, 243, 303, 414 bp (3), SCCmecIIIA için 162, 209, 243, 414 bp (6), SCCmecIV için 162,342 bp (2) büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak SCCmecI için *S. aureus* COL, SCCmecIA için *S. aureus* PER34, SCCmec II için *S. aureus* BK2464, SCCmec III için *S. aureus* ANS46, SCCmec IIIA için *S.aureus* HU25, SCCmec IV için *S. aureus* HDE288 kullanıldı (7= negatif kontrol).

3.7. Pulsed-Field Jel Elektroforezi

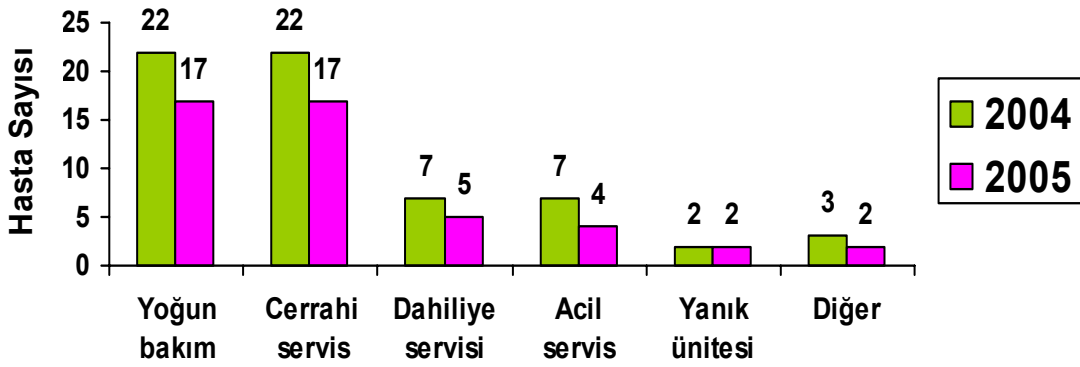
24 saatlik bakteri kültüründen tek koloni 5 ml'lik Mueller-Hinton besiyerine ekilip 37°C'de 20–24 saat inkübe edildi. Bu süspansiyon 10 dakika 3000 RPM'de santrifüj edildi. Üst sıvı atılıp çökeltiye 1000 µl PIV (0.1 M Tris tamponu pH 8.0, 1 M NaCl) ekleyip 10 dakika 14000 RPM'de santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak çökelti 200 µl PIV ile sulandırıldı ve UV spektrofotometre ile OD 620'de (40xoptik dansitex210)-210 örnekler okutularak eklenecek PIV miktarı hesaplandı. Bir mikrosantrifüj tüpüne bu süspansiyondan 150 µl konuldu ve buna PIV tamponu ile % 2 oranında sulandırılmış Seaplaque (“low-melting” agaroz) agarozdan 150 µl eklenip diskler hazırlandı. Daha sonra diskler 15 ml'lik tüplere 1 ml EC lizis solüsyonunda [6 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0, %0.2 sodyum deoksikolat, %0.5 sodyum loril sarkozin, 50 µg/ml RNAaz (10 mg/ml), 100 µg/ml lizozim (20 mg/ml), 50 µg/ml lizostafin (10 mg/ml)] 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra EC lizis solüsyonu dökülüp yeni hazırlanmış ESP tampon solüsyonunda [proteinaz K (1 mg/ml) ve ES solüsyonu (100 ml 0.5 M EDTA (pH:9.0) ve 1 gr %1'lik sodyum lauryl-sarkozin)] 50°C'de bir gece bekletildi. Sonra ESP solüsyonu döküldü ve 12 ml 1xTE tamponu içinde 5 kez oda sıcaklığında otuzar dakika aralıklarla yıkandı. En son olarak 1 ml'lik 1xTE tamponunda +4°C'de elektroforez işlemine kadar saklandı. DNA diskleri daha sonra SmaI restriksiyon enzimi ile kesildi. Bu işlem için önce SmaI restriksiyon tamponuna bir disk konulup 30 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra tampon atılıp SmaI enziminden 15 ünite içeren restriksiyon tamponundan 45 µl eklendi ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Restriksiyonun sonlanması için 10 µl yükleme tamponu (25 mg bromfenol mavisi, 10 ml 1xTE tamponu, 10 ml gliserol ve 1 N NaOH) eklenip 15 dakika beklendi ve daha sonra 0,5 X TBE (Tris, 50mM Borik asit, 0.2mM EDTA) tamponu içeren %1,1'lik PFGE agarozuna yüklendi (Sea Kem LB Agarose FMP Bioproducts). Soğutucunun ısı ayarı 11.3°C olarak ayarlandı. PFGE için kullanılan elektroforez tankının (Gene Navigator, Pharmacia, İsveç) “pulse” parametreleri başlangıç zamanı 1 sn, bitiş zamanı 30 sn, çalışma süresi 22 saat ve voltaj 200 v=6.0 olarak ayarlandı. Jel 30 dakika etidyum bromid ile boyanıp Alpha Imager (Alpha Innotech, Kanada) ile incelendi (84).

3.8. Etik Kurul İzni

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun LUT 06/81-13 karar numaralı etik kurul izni ile yapıldı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi tarafından desteklendi.

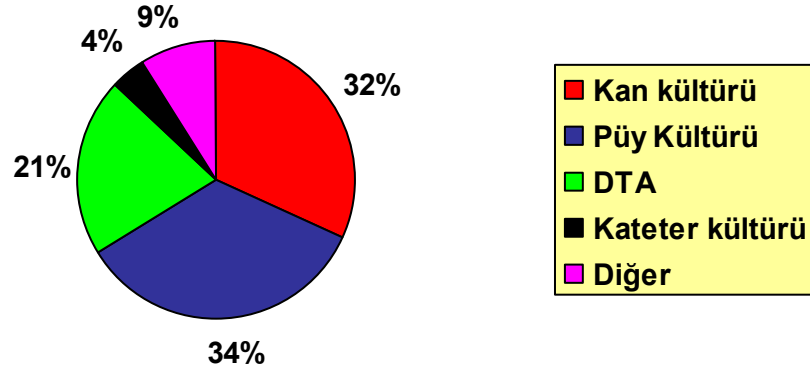
4. BULGULAR

1 Ocak 2004–31 Aralık 2005 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi servislerinde HK-MRSA kriterlerine uyan toplam 110 suş çalışmaya dahil edildi. 1 Ocak 2004–31 Aralık 2004 tarihleri arasında 63 HK-MRSA suşu izole edilirken, 1 Ocak 2005–31 Aralık 2005 tarihleri arasında HK-MRSA suşu sayısı 47 olarak saptandı. MRSA suşlarının servislere göre dağılımlarına bakıldığında; 39 suşun (%35.5) yoğun bakım ünitelerinden (beyin cerrahi yoğun bakım ünitesi, genel cerrahi yoğun bakım ünitesi ve iç hastalıkları yoğun bakım ünitesi), 39 suşun (%35.5) cerrahi servislerden (genel cerrahi, beyin cerrahisi, plastik cerrahi, üroloji, ortopedi, kulak burun boğaz, kalp-damar cerrahisi servisleri), 12 suşun (%10.9) iç hastalıkları servislerinden, 11 suşun (%10) acil servis gözlem ünitesinden (yatış süresi >72 saat olan hastalar), 4 suşun (%3.6) yanık ünitesinden, 5 suşun (%4.5) diğer servislerden (dermatoloji, nöroloji, psikiyatri) gelen klinik örneklerden izole edildiği saptandı. Şekil 4.1, yıllara göre MRSA suşlarının servislerdeki dağılımını göstermektedir.



Şekil 4.1. MRSA suşlarının yıllara göre servislere dağılımı

MRSA'nın izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde; 37 suşun püvy kültüründe (%34), 35 suşun kan kültüründe (%32), 23 suşun derin trakeal aspirasyon (DTA) kültüründe (%21), 5 suşun kateter kültüründe (% 4), 10 suşun (%9) diğer örnek kültürlerinde (beyin-omurilik sıvısı, idrar, bronkoalveolar lavaj sıvısı, balgam, eklem sıvısı) ürediği görüldü (Şekil 4.2). Tablo 4.1'te MRSA suşlarının izole edildiği servislere ve örnek türlerine göre dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 4.2. HK-MRSA suşlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı

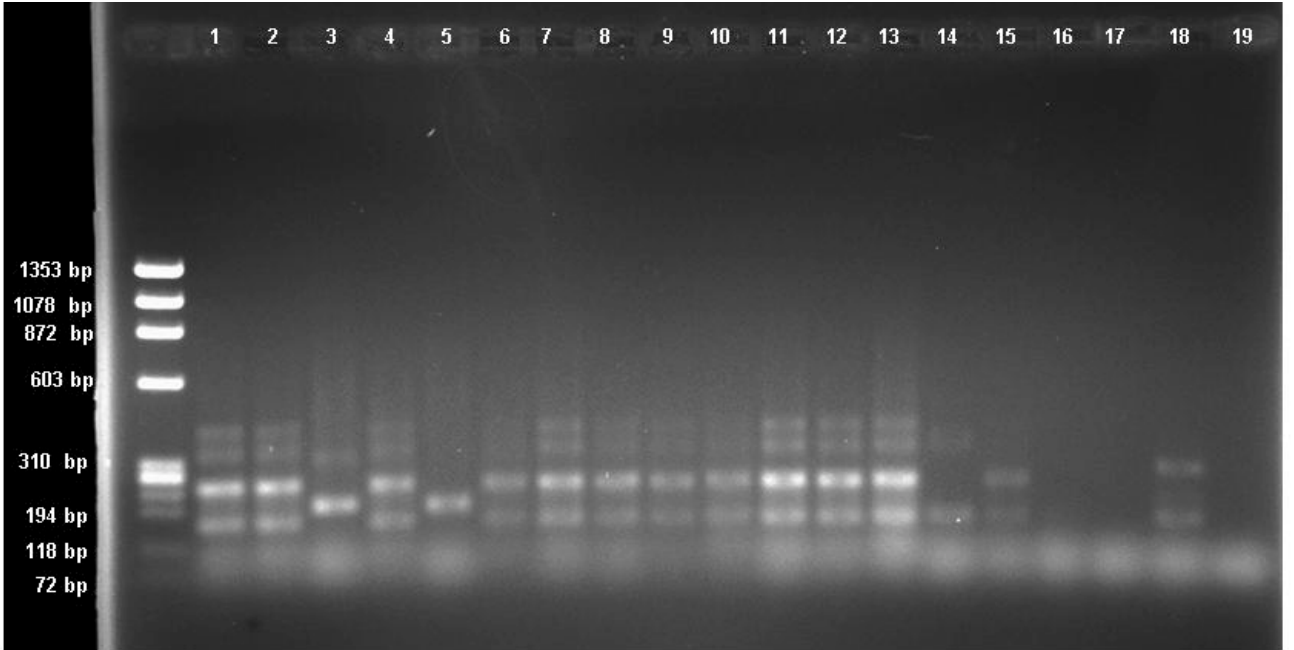
Tablo 4.1. MRSA suşlarının izole edildiği servislere ve örnek türlerine göre dağılımı

Servis	MRSA İzole Edilen Örnek Sayısı									
	Kan	Püy	DTA	Kateter	BAL	BOS	Balgam	İdrar	Eklem	Toplam
BCDBÜ	5	1	13		2	2				23
Dahiliye	6	4	1				1			12
BCS	4	3	3		1					11
BAS	3	4	3	1						11
GCDBÜ	3	6	1							10
GCS	3	1	2	2	1					9
Üroloji	3	1		1			1	1		7
DDBÜ	3	2		1						6
PCS		6								6
Yanık Ü	2	2								4
Ortopedi	1	1							1	3
KBBS		2								2
KDCS		1								1
Diğer	2	3								5
Toplam	35	37	23	5	4	2	2	1	1	110

Açıklamalar: BCDBÜ=Beyin cerrahi devamlı bakım ünitesi, GCDBÜ=Genel cerrahi devamlı bakım ünitesi, BCS=Beyin cerrahi servisi, GCS=Genel cerrahi servisi, BAS=Büyük acil servisi, DDBÜ=Dahiliye devamlı bakım ünitesi, PCS=Plastik cerrahi servisi, KDCS=Kalp-damar cerrahi servisi, DTA=Derin trakeal aspirasyon, BAL=Bronkoalveolar lavaj, BOS=Beyin-omurilik sıvısı, KBBS= Kulak-burun boğaz servisi

4.1. SCCmec Tiplendirmesi

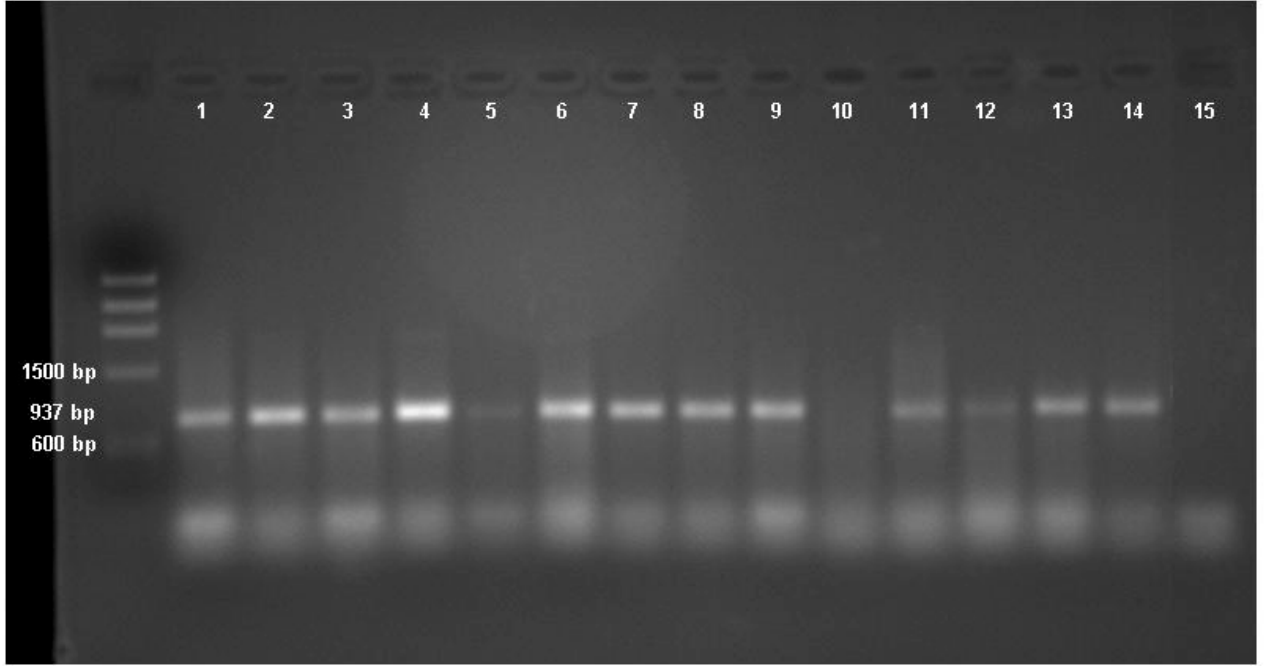
110 MRSA suşuna uygun primerler kullanılarak multipleks PZR metodu uygulandı. Tüm suşlar taşıdıkları SCCmec genine göre (SCCmec I, SCCmec IA, SCCmec II, SCCmec III, SCCmec IIIA, SCCmec IIIB, SCCmec IV) tiplendirildi (Şekil 4.3). 68 suшта SCCmec III (%61.8), 38 suшта SCCmec varyant tip IIIB (%34.5), 3 suшта SCCmec IV (%2.7) saptandı. Bir suшта *mecA* geni pozitif olup, SCCmec geni 2 kez analiz edilmesine rağmen mevcut SCCmec tipleri arasında sınıflandırılmadı.



Şekil 4.3. Multipleks PZR yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirmesi.

4.2. PVL genlerinin tespiti

110 MRSA suşu PZR yöntemi ile PVL genlerine yönelik uygun primerler kullanılarak incelendi. 110 suşun 14'ünde PVL pozitifliği saptandı (% 12.7) (Şekil 4.4). PVL pozitif izolatların 10'unu SCCmec III, 4'ünü SCCmec varyant tip IIIB taşıyan suşlar oluşturmaktaydı. SCCmec IV taşıyan suşların hiçbirinde PVL pozitifliği saptanmadı. Tablo 4.2, HK-MRSA suşlarının SSCmec tiplendirmesi ve PVL varlığına göre dağılımını göstermektedir.



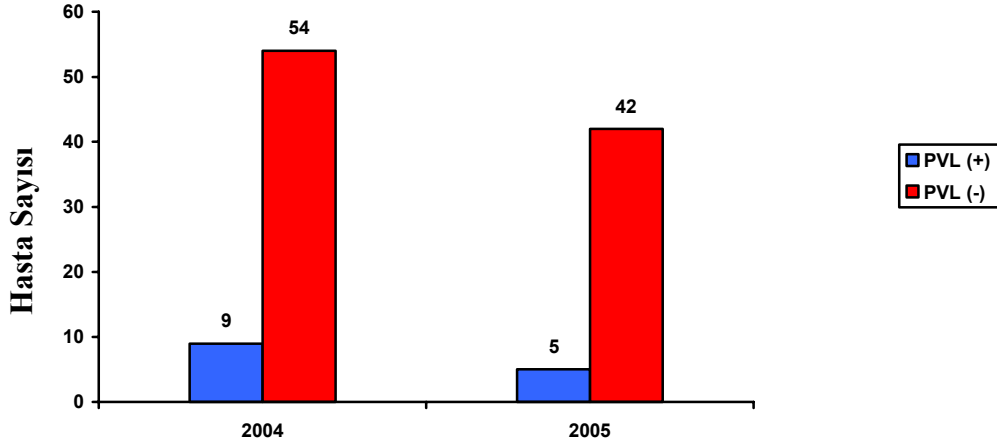
Şekil 4.4. PZR yöntemi ile MRSA izolatlarında PVL gen varlığının gösterilmesi. 937 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 49775 kullanıldı.

Tablo 4.2. HK-MRSA suşlarının *SSCmec* tiplendirmesi ve PVL varlığına göre dağılımı

SCC <i>mec</i> Tipi	PVL (+)	PVL (-)	Toplam
SCC <i>mec</i> I	0	0	0
SCC <i>mec</i> IA	0	0	0
SCC <i>mec</i> II	0	0	0
SCC <i>mec</i> III	10	58	68
SCC <i>mec</i> IIIA	0	0	0
SCC <i>mec</i> IIIB	4	34	38
SCC <i>mec</i> IV	0	3	3
Sınıflandırılmayan	0	1	1
Toplam	14	96	110

Açıklamalar: PVL=Panton-valentine lökosidin

2004 yılında izole edilen HK-MRSA suşları arasında PVL pozitif suş sayısı 9, 2005 yılında PVL pozitif suş sayısı 5 olarak bulundu. Şekil 4.5, yıllara göre PVL pozitif ve PVL negatif suşların dağılımını göstermektedir.



Şekil 4.5. PVL pozitif ve PVL negatif suşların yıllara göre dağılımı.

PVL pozitif suşların servislere göre dağılımına bakıldığında yoğun bakım ünitelerinde (GCDBÜ, BCDBÜ, DDBÜ) 5, cerrahi servislere 4, iç hastalıkları servislere 2, büyük acil servisinde 2, dermatoloji servisinde 1 PVL pozitif MRSA suşu saptandı. PVL pozitif suşların izole edildikleri örnek gözönüne alındığında; 8 suşun kan kültüründe, 5 suşun DTA kültüründe, 1 suşun ise pü kültüründe ürediği belirlendi. Tablo 4.3'te PVL pozitif MRSA suşların servislere ve izole edildikleri örnek türüne göre dağılımları gösterilmiştir.

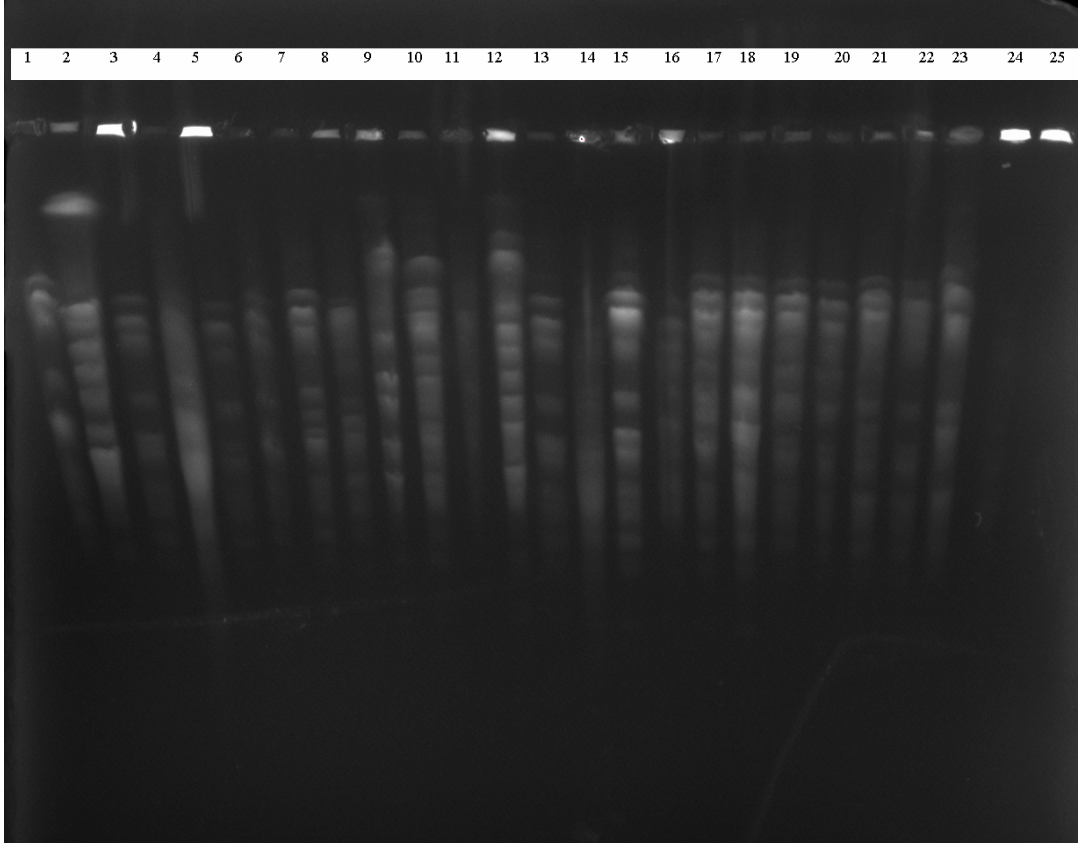
Tablo 4.3. PVL pozitif MRSA suşlarının servislere ve izole edildikleri örnek türüne göre dağılımları

Servis	Örnek Türü			
	Kan	DTA	Püy	Toplam
BCDBÜ		3		3
Dahiliye	1		1	2
BAS	2			2
DDBÜ	1			1
GCDBÜ		1		1
GCS	1			1
BCS		1		1
Üroloji	1			1
Ortopedi	1			1
Dermatoloji	1			1
Toplam	8	5	1	14

Açıklamalar: BCDBÜ=Beyin cerrahi devamlı bakım ünitesi, GCDBÜ=Genel cerrahi devamlı bakım ünitesi, BCS=Beyin cerrahi servisi, GCS=Genel cerrahi servisi, BAS=Büyük acil servisi, DDBÜ=Dahiliye devamlı bakım ünitesi, DTA=Derin trakeal aspirasyon

4.3. Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi

Tüm MRSA suşları PFGE paternlerine göre değerlendirildiğinde 8 klonal tip ayırt edildi (klon A, B, C, D, K, L, N, O). Tüm klonlar arasında klon A'nın majör klon olduğu, MRSA suşlarının % 92.7'sinin (n=102) bu klona ait olduğu saptandı (Şekil 4.6). PVL pozitif MRSA suşları PGFE paterni açısından incelendiğinde 11 suşun (%79) klon A, 1 suşun (%7) klon C, 1 suşun (%7) klon D, 1 suşun (%7) klon N içinde gruplandırıldığı belirlendi. SCC_{mec} IV taşıyan üç suşun tamamının, SCC_{mec} III taşıyan suşların %91, SCC_{mec} IIIB taşıyan suşların %94.7'sinin majör klona dahil olduğu saptandı. Tablo 4.4, MRSA suşlarının klonalite, SCC_{mec} tipi, PVL gen varlığı, izole edildiği servis ve örnek türüne göre dağılımını göstermektedir.



Şekil 4.6. MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin gösterilmesi.

Tablo 4.4. MRSA suşlarının klonalite, SCCmec tipi, PVL gen varlığı, izole edildiği servis ve örnek türüne göre dağılımı

Klon	SCCmec Tipi			PVL(+)	Servisler						Örnek Türleri						
	III	IIIB	IV		Dahiliye	Cerrahi	CDBÜ	DDBÜ	BAS	Diğer	Kan	Püy	DTA	Kateter	BAL	BOS	Diğer
A	62	36	3	11	10	40	31	5	10	6	31	36	20	5	4	2	4
B		1				1						1					
C		1		1				1			1						
D	1			1					1		1						
K	1					1					1						
L	1				1								1				
N	1			1			1						1				
O	2				1		1				1		1				
Toplam	68	38	3	14	12	42	33	6	11	6	35	37	23	5	4	2	4

Açıklamalar: CDBÜ=Cerrahi devamlı bakım ünitesi, BAS=Büyük acil servisi, DDBÜ=Dahiliye devamlı bakım ünitesi, PVL=Panton-valentine lökositin, DTA=Derin trakeal aspirasyon, BAL=Bronkoalveolar lavaj, BOS=Beyin-omurilik sıvısı

4.4. Antibiyotik Duyarlılığı

110 HK-MRSA suşunun antibakteriyel direnç paterni incelendiğinde suşların, siprofloksasine %97.3, rifampisine %92.7, gentamisine %88, eritromisine %70, klindamisine %39, TMP-SMX'e %10 oranında dirençli olduğu saptandı. Tüm suşların tigesiklin, vankomisin, teikoplanin ve linezolide duyarlı olduğu tespit edildi. PVL negatif suşların antibiyotik direnç paternleri incelendiğinde siprofloksasin direnci %98, rifampisin direnci %92.7, gentamisin direnci %88.5, eritromisin direnci %66, klindamisin direnci %37, TMP-SMX direnci %8 olarak saptandı. PVL pozitif MRSA suşlarında ise direnç oranları sırasıyla %92.8, %92.8, %85.7, %78.5, %50 ve %21.4 olarak bulundu. SCC_{mec} IV taşıyan üç suştan birinin tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, bir diğerrinin yalnızca gentamisin ve siprofloksasine dirençli olduğu, üçüncü suşun eritromisin, klindamisin, rifampisin, gentamisin ve siprofloksasine dirençli olduğu saptandı. Tablo 4.5, MRSA suşlarının SCC_{mec} tipleri, PVL gen varlığı, klonalite ve antibiyotik duyarlılığına göre dağılımlarını göstermektedir.

Tablo 4.5. MRSA suşlarının SCCmec tipleri, PVL gen varlığı, klonalite ve antibiyotik duyarlılığına göre dağılımı

MRSA No	Örnek türü	SCCmec	PVL	Klonalite	Antibiyotik Duyarlılıkları									tigesiklin
					eritr	klin	TMP-SMX	rif	gen	cipro	line	van	teiko	
1	kan	yok	-	A	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
3	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
4	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
5	kateter	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
6	kan	IV	-	A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	kan	IIIB	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
8	BOS	III	-	A	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
9	püy	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
11	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
12	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
14	kan	IIIB	+	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
15	kateter	IIIB	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
16	püy	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
18	kan	IIIB	-	A	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S
20	kan	IIIB	-	A	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
22	kan	III	+	A	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
29	püy	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
31	kan	IIIB	+	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
32	kan	III	+	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
36	püy	IIIB	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
37	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
39	kateter	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
40	BAL	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
41	püy	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
42	DTA	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
43	kan	III	+	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
46	DTA	III	+	N	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
47	püy	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
49	DTA	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
50	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
51	püy	III	+	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
52	püy	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
53	DTA	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
54	püy	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
57	kan	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
58	kan	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
59	püy	IIIB	-	A	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
61	püy	IIIB	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
62	püy	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
63	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
64	kan	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
66	DTA	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
67	püy	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
70	püy	IIIB	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
71	DTA	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
72	BAL	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
73	DTA	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
74	püy	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
77	DTA	IIIB	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
80	idrar	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
81	DTA	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
82	DTA	III	-	L	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
83	püy	IIIB	-	B	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
84	DTA	III	-	O	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
85	püy	IV	-	A	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
87	DTA	III	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S

Tablo 4.5. “Devam”

MRSA No	Örnek türü	SCCmec	PVL	Klonalite	Antibiyotik Duyarlılıkları									tigesiklin
					eritr	klin	TMP-SMX	rif	gen	cipro	line	van	teiko	
88	DTA	III B	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
89	DTA	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
90	DTA	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
91	BOS	III	-	A	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
92	DTA	III	+	A	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
93	DTA	III B	+	A	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
94	DTA	III	-	A	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
95	kan	III	-	K	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
96	kan	III	+	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
97	kan	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
98	püy	III	-	A	R	I	?	R	R	R	S	S	S	S
99	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
100	püy	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
101	püy	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
102	kan	III B	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
103	püy	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
104	kateter	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
105	DTA	III	+	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
106	BAL	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
107	BAL	III B	-	A	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
108	kan	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
109	balgam	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
110	püy	III B	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
111	püy	III	-	A	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
112	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
113	Eklemsivisi	III	-	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
114	DTA	III	-	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
115	DTA	III	+	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
116	püy	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
117	DTA	III	-	A	R	I	S	R	S	R	S	S	S	S
118	kan	III	-	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
119	püy	III B	-	A	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
120	kan	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
121	püy	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
122	kateter	III	-	A	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S
123	kan	III B	-	A	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
124	balgam	III	-	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
125	püy	III B	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
126	püy	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
127	püy	III	-	A	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
128	kan	III	-	A	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S
129	kan	III	-	A	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S
130	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
131	püy	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
132	püy	III	-	A	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S
133	DTA	III	-	A	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S
1690	kan	III	-	O	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
1693	kan	III	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
1710	kan	III B	-	A	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S
Mys04/19	püy	III B	-	A	R	I	S	R	S	R	S	S	S	S
1714	kan	III B	-	A	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
1719	kan	III	+	D	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S
1727	kan	III B	+	C	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
1735	kan	IV	-	A	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S

Açıklamalar: DTA=Derin trakeal aspirasyon, BAL=Bronkoalveolar lavaj, BOS=Beyin-omurilik sıvısı, SCCmec=Stafilokokal kaset kromozom mec, PVL=Panton-valentine lökosidin, klin=klindamisin, TMP-SMX=trimetoprim-sulfametoksazol, rif=rifampisin, eritr=eritromisin, gen=gentamisin, cipro=siprofloksasin, line=linezolid, van=vankomisin, teiko=teikoplanin, R=dirençli, S=duyarlı, I=orta duyarlı

5. TARTIŞMA

Otuz yıl boyunca MRSA hastane kaynaklı infeksiyonların önemli bir etkeni olmuştur. Metisilin direnci ülkelere göre değişkenlik göstermekle birlikte ABD ve Güney Avrupa'da prevalansı en yüksek, Kuzey Avrupa'da ise en düşük düzeylerdedir. TK-MRSA'nın ortaya çıkmasıyla literatürde büyük bir kargaşa yaşanmaya başlamıştır, çünkü HK-MRSA kazanımı için risk faktörü taşımakta olup (daha önce hastanede yatış öyküsü olanlar, bağışıklık sistemi baskılanmış olanlar gibi) toplum içinde hastane kaynaklı infeksiyona yakalananlar ile sadece toplumda bulunan MRSA suşları aracılığıyla “gerçek” toplum kaynaklı infeksiyona yakalananlar arasındaki ayırım oldukça güçleşmiştir. Bu nedenle birtakım demografik ve genetik özellikler toplum ve hastane kaynaklı suşların ayırımında kullanılmıştır. Hastane kaynaklı suşlar özellikle yaşlı bireyleri infekte ederken toplum kaynaklı suşlar daha çok genç bireyleri hedef almaktadır. Diğer bir önemli demografik özellik, hastane kaynaklı suşların cerrahi yaralar ve damar içi kateterler ile, toplum kaynaklı suşların ise başlangıçta cilt lezyonu olmayan hastalarda deri ve yumuşak doku infeksiyonları ile ilişkili olmasıdır. Genetik özellikler gözönüne alındığında, hastane kaynaklı suşların *SCC_{mec}* I-II-III, toplum kaynaklı suşların ise *SCC_{mec}* IV ile ilişkili olması önemli bir ayırt edici özellik olarak kullanılmaktadır. 1999 yılında TK-MRSA prototipinin genomunun sekanslanmasıyla önemli bir virulans faktörü olarak PVL geni gösterilmiştir. Ardından yapılan birçok çalışmada PVL'nin toplum kaynaklı suşların hemen tümünde bulunduğu gösterilmiş ve hastane kaynaklı suşlardan ayırimda önemli bir özellik olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmaya dahil edilen MRSA suşlarının servislere göre dağılımlarına bakıldığında; suşların yaklaşık %75'inin yoğun bakım, cerrahi servisler ve yanık ünitesinden izole edildiği görülmektedir. Bu bölümlerde yatmakta olan hastaların daha çok invaziv işleme maruz kalması, altta yatan hastalığın diğer hastalara göre daha ağır seyretmesi ve immünsupresyon sıklığının ve derecesinin daha fazla olması HK-MRSA infeksiyonun bu bölümlerde oldukça yüksek oranda görülmesini açıklar niteliktedir.

MRSA infeksiyonu vücutta en sık yara yerleri, cilt, dolaşım sistemini tutmakta, ardından sıklık sırasına göre alt solunum yolu ve üriner sistem

tutulmaktadır. Bizim çalışmamızda MRSA suşlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde; sırasıyla pü, kan ve DTA örnekleri tüm üremelerin %86'sını oluşturmaktadır. Bu bulgu literatür ile uyum göstermektedir. Minnesota'da yapılan bir çalışmada Naimi ve arkadaşları TK- ve HK-MRSA ile infekte vakaları incelemiş, HK-MRSA infeksiyonlarının %37'sini deri ve yumuşak doku, %22'sini solunum yolu, %20'sini idrar yolu, %9'unu ise dolaşım sistemi infeksiyonlarının oluşturduğunu rapor etmiştir (85). Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta MRSA suşlarının %33'nün kan kültüründe üretilmiş olmasıdır. MRSA bakteremisi invaziv bir infeksiyon olup prognozu olumsuz yönde etkilemektedir (86,87). MRSA bakteremisi erişkin yaş grubunda-özellikle yaşlılarda-sık görülmekle birlikte çocuklarda da görülme sıklığı giderek artmaktadır (88). Yatan hastalarda bakteremi riski servislere göre farklılık göstermektedir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada MRSA bakteremisi genel cerrahi servisinde %58-60, yoğun bakım ünitesinde %9.5, pediatri servisinde %6.3 olarak bulunmuştur (89). Bizim çalışmamızda Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında kan kültüründen izole edilen MRSA suşlarının servislere göre dağılımına bakıldığında; yoğun bakım üniteleri (DDBÜ, GCDBÜ, BCDBÜ) %31.4, cerrahi servisler %31.4, dahiliye servisi %17.1 ve yanık ünitesi %5.7 şeklinde sıralanmaktadır (Tablo 4.1). Cerrahi servislerde dahiliye servislerine göre kan kültürü pozitifliği belirgin olarak fazla olmakla birlikte hastaların ve hastalıkların oldukça heterojen özellikte olması nedeniyle etiyojolojiye yönelik kesin bir yorum yapmak oldukça zordur.

SCCmec TK- ve HK-MRSA suşlarının ayırımında oldukça önemli bir özelliktir. Birçok çalışmada TK-MRSA'ların tümünde *SCCmec* tip IV gösterilmiştir (8,37,38,39). Bu nedenle *SCCmec* tip IV taşıyan suşlar kesin olarak TK-MRSA olarak kabul edilmektedir. PVL pozitifliği de MRSA suşunun toplum kökenli olduğunun en önemli kanıtı olarak görülmektedir. Hatta Dufour ve arkadaşları HK-MRSA suşlarında PVL gen varlığının hiçbir zaman saptanmadığını belirtmişlerdir (58). Ancak Wannet ve arkadaşları 2004 yılında Hollanda'da yaptıkları bir çalışmada 2003 yılına ait MRSA suşlarını *SCCmec* tipi ve PVL varlığı açısından incelemişler, PVL pozitif suşların %65'inde *SCCmec* tip IV, %20'sinde *SCCmec* tip III ve %15'inde *SCCmec* tip I'e rastlamışlardır (90). Bu bulgu oldukça şaşırtıcı olup değişik yorumlara yol açmıştır. Bazı yazarlar bunu *SCCmec* tip IV'ün bundan böyle

TK-MRSA için evrensel bir özellik olmayacağı şeklinde yorumlamışlardır (91). Çalışmayı yapan araştırmacılar ise SCCmec tip III ve SCCmec tip I'in hastane kökenli suşları temsil etmeleri nedeniyle HK-MRSA suşlarının da PVL geni bulundurabileceğini savunmuşlardır (90). Ayrıca PVL pozitif suşların sadece toplumda değil hastane ortamında da bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. 2005 yılında Tunus'ta bir üniversite hastanesinde 2003-2004 yılları arasında 72 TK-MRSA suşu SCCmec tipi ve PVL varlığı açısından incelenmiş, 66 suşta SCCmec IV ve IVA, 4 suşta SCCmec tip III, 2 suşta SCCmec IIIB saptanmıştır. İlginç olarak SCCmec IV yanında tüm SCCmec tip III MRSA suşlarında da PVL pozitifliği saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu PVL geni taşıyan fajların çeşitli suşlar arasında kolay yayılımına bağlamışlardır (92). 2005 yılında İsveç'te yapılan bir çalışmada ise PVL pozitif olup herhangi bir SCCmec tipine uymayan MRSA suşları tespit edilmiştir (93). Bu çalışmalar göstermektedir ki TK- ve HK-MRSA'larda genotipik ve epidemiyolojik alanda alışlagelmiş özelliklerden farklı olarak yeni birtakım değişimler gözlenmektedir. Bunlardan en önemlisi, SCCmec tip IV dışında farklı SCCmec tipleri taşıyan HK-MRSA suşlarının PVL genlerini bulundurabilmesi ve infeksiyonlara yol açabilmesidir.

Bizim çalışmamızda Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen HK-MRSA suşlarının %12.7'sinde PVL pozitifliği saptandı. PVL pozitif izolatların 10'unu SCCmec III, 4'ünü SCCmec varyant IIIB taşıyan suşlar oluşturmaktaydı. Bu bulgu HK-MRSA suşlarının yeni genotipik özellikler kazanması açısından literatürle uyumlu görülmektedir. HK-MRSA yaşlı, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda önemli infeksiyon nedenidir. TK-MRSA'ya göre daha invaziv bir infeksiyona neden olmaktadır. PVL ise toplum kökenli suşlarda en önemli virülans faktörü olup PVL üreten TK-MRSA deri ve yumuşak doku infeksiyonları yanında ciddi nekrotizan pnömoni ve sepsis vakalarına da neden olmaktadır. Bu hastalarda ölüm oranı %35'e ulaşmaktadır (77,78). İnvaziv seyreden bir HK-MRSA suşunun PVL gen kazanımının invaziv infeksiyon derecesini ve mortaliteyi ciddi şekilde artıracığı açıktır. Çalışmamızda PVL pozitif suşların servislere göre dağılımına bakıldığında PVL pozitif suşların yaklaşık %36'sının (5/14) yoğun bakım ünitelerinde (GCDBÜ, BCDBÜ, DDBÜ) olduğu görülmektedir (Tablo 4.3). Bu durum yoğun bakım

ünitelerinde invaziv ve mortal seyreden infeksiyonlarda artış olabileceği anlamına gelmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde izole edilen PVL pozitif MRSA suşlarının, %80'inin DTA örneğinde, %20'sinin ise kan kültüründe ürediği saptanmıştır.

PVL pozitif MRSA ile ilişkili diğer önemli bir epidemiyolojik veri bu suşların ciddi oranda hastane infeksiyonlarına yol açmasıdır. 2005 yılında Cezayir Mustafa Paşa Hastanesi'nde yapılan bir araştırmada 20 TK-MRSA infeksiyonu ve 41 HK-MRSA infeksiyonu vakasından izole edilen MRSA suşları PVL varlığı, SCC*mec* tipi ve antibiyotik direnci açısından incelenmiştir. Toplum kökenli infeksiyonların %86'sında ve hastane kökenli infeksiyonların %67.5'inde PVL pozitifliği saptanmıştır. PVL pozitif suşların hepsinin SCC*mec* tip IV veya IVA taşıdığı tespit edilmiştir. Hastane kökenli infeksiyonlarda SCC*mec* tip IV-PVL pozitif suşun bu kadar yüksek oranda saptanması belirli bir toplumsal klona bağlı hastane salgını olabileceği, hastane personelinin bu klonu hastane içine bulaştırmış olabileceği veya Cezayir halkında PVL pozitif MRSA taşıyıcılığının yüksek oranlarda olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (94). 2005 yılında Yunanistan'da yapılan bir çalışmada Patras Üniversite Hastanesi'nde PVL pozitif-SCC*mec* IV taşıyan HK-MRSA'ların tüm HK-MRSA suşlarına oranı 2001'de %24 iken 2003'te %64'e yükseldiği tespit edilmiştir (95). Bu durum Patras Üniversite Hastanesi'nde PVL pozitif HK-MRSA infeksiyon insidansında belirgin bir artış olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamızda 2004 yılında izole edilen HK-MRSA suşları arasında PVL pozitif suş sayısı 9, 2005 yılında PVL pozitif suş sayısı 5 olarak bulundu (Şekil 4.5). Bu veri hastanemizde PVL pozitif HK-MRSA infeksiyon insidansında bir artış olmadığını göstermekle birlikte kesin yorum yapabilmek için ardışık yılların verilerine ihtiyaç vardır.

Hastanemizde iki yıl içinde izole edilen 110 MRSA suşu taşıdıkları SCC*mec* genine göre tiplendirildiğinde 68 suшта SCC*mec* III, 38 suшта SCC*mec* varyant IIIB, 3 suшта SCC*mec* IV saptandı. Bir suшта *mecA* geni pozitif olup, SCC*mec* geni mevcut SCC*mec* tipleri arasında sınıflandırılmadı. PVL pozitif suşların hiçbiri SCC*mec* IV taşımadığından toplum kökenli bir klonun sebep olduğu bir hastane salgınından, toplumdan taşıyıcılık yoluyla hastane ortamına PVL pozitif suşların taşındığından ya da sağlık personeli tarafından PVL pozitif suşların hastane ortamına bulaştırıldığından bahsedilemez. O halde PVL geninin hastane kökenli suşlara uygun

bir vericiden belirli bir mekanizmayla ‐taşındığı‐ düşünülebilir. Burada en uygun olabilecek açıklama literatürde belirtildiği gibi PVL geninin fajlar aracılığıyla HK-MRSA suşlarına taşınmış olma olasılığıdır.

Hastanemizde Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında izole edilen MRSA suşlarının büyük bir çoğunluğunun tek bir klona ait olduğu saptandı. Bu tarihler arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde gelişen MRSA’ya bağlı infeksiyonların tek bir MRSA klonunun hastane içinde yayılımından kaynaklandığı düşünülebilir. Cerrahi servislerde ve yoğun bakım ünitelerinde daha ağırlıklı olmak üzere hemen tüm servislerde aynı klona bağlı MRSA infeksiyonu görülmesi (Tablo 4.4), infeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasındaki aşamaların yeniden gözden geçirilmesini, sağlık personeline hijyenik kurallar ve el yıkama alışkanlığının kazandırılarak doğrudan temasla bulaş olasılığının azaltılmaya çalışılmasını zorunlu kılmaktadır. Hastanemizdeki PVL pozitif MRSA suşlarının klonalitesi PVL negatif MRSA suşlarıyla önemli oranda benzerlik göstermektedir. PVL pozitif suşların çoğunluğunun, PVL negatif suşlar ile aynı klona ait bulunması yukarıda bahsedildiği üzere HK-MRSA suşlarına PVL geninin belirli bir mekanizma ile taşındığı görüşünü desteklemektedir. Bu durumda PVL pozitif MRSA suşlarının hastane içindeki tüm MRSA suşlarına oranının sonraki yıllarda artış göstermesi beklenmelidir.

Çalışmamızda incelediğimiz MRSA suşlarında siprofloksasin, rifampisin, gentamisin, eritromisin ve klindamisinine karşı yüksek oranda direnç saptanması, buna karşın vankomisin, teikoplanin, linezolid ve tigesikline tüm suşların duyarlı olması, glikopeptid antibiyotikler, linezolid ve tigesiklinin HK-MRSA infeksiyonlarında tercih edilmesi gereken tedavi şekli olduğunu desteklemektedir. PVL pozitif suşların duyarlılık paterni incelendiğinde siprofloksasin, gentamisin ve rifampisine karşı direnç oranının PVL negatif suşlar ile benzer olduğu; eritromisin, klindamisin ve TMP-SMX’a karşı direnç oranının PVL negatif suşlara kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak her iki grubun da glikopeptid antibiyotiklere duyarlı olmaları nedeniyle bu farklılık tedavi açısından bir önem taşımamaktadır.

SCC*mec* IV taşıyan üç MRSA suşunun direnç paternleri incelendiğinde bir suşun tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu suş diğer SCC*mec* IV taşıyan suşlar gibi PVL negatif olup, PFGE paternine göre A klonuna aittir. Üroloji servisinde yatmakta olan bir hastanın kan kültürü örneğinden izole edildiği tespit

edilmiştir. Bu suşun neden olduğu infeksiyon, HK-MRSA infeksiyon kriterlerine uymakla birlikte, izolatın diğerlerinden farklı olarak tüm antibiyotiklere duyarlı olması toplum kökenli bir MRSA suşu olma olasılığını akla getirmektedir.

MRSA Türkiye’de 1980’li yıllarda önemli bir hastane infeksiyonu etkeni patojen olarak ortaya çıkmıştır. HK-ve TK-MRSA prevalansı ve antimikrobiyal direnç paterni ile ilgili ulusal bir çalışması olmamakla birlikte bölgesel raporlar mevcuttur (96). Fakat mevcut veriler problemin boyutu ile ilgili net bir bilgi vermemektedir (97). 1993 yılında yapılan bir çalışmada farklı bölgelerdeki 29 hastaneden toplanan 1826 klinik izolat değerlendirilmiş ve metisilin direncinin farklı merkezlerde %7–55 arasında değiştiği saptanmıştır (98). Çeşitli merkezlerden gelen veriler diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de MRSA infeksiyon sıklığının ve MRSA oranının giderek arttığını göstermektedir. Bu nedenle ulusal nitelikli, standart, düzenli bir sürveyans sistemi ile tüm büyük hastanelerde bu önemli patojene yönelik veri toplama ve transfer işlemleri gerçekleştirilmeli, elde edilen bilgiler diğer ülkeler ile karşılaştırılmalıdır (99). Yapmış olduğumuz çalışma sadece Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’ni kapsamakta, Türkiye için bir genelleme yapmaya imkân vermemektedir. Benzer çalışmaların Türkiye’deki diğer büyük hastanelerde de gerçekleştirilmesi HK-MRSA’nın genetik özelliklerinin ve virülans faktörlerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

- 1 Ocak 2004–31 Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen *mecA* geni (+) 110 MRSA suşunun servislere göre dağılımlarına bakıldığında; yoğun bakım, cerrahi servisler ve yanık ünitesinden izole edilen MRSA izolatlarının tüm suşların yaklaşık %75'ini oluşturduğu saptandı.
- MRSA'nın izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde; %34'ünün püü kültüründe, %32'sinin kan kültüründe, %21'nin DTA kültüründe ürediği saptandı. Bu örneklerdeki üremeler tüm üremelerin %86'sını oluşturmaktadır.
- Ocak 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen HK-MRSA suşlarının %12.7'sinde PVL pozitifliği saptandı.
- PVL pozitif suşların yaklaşık %36'sının yoğun bakım ünitelerinde olduğu saptandı. Yoğun bakım ünitelerinde izole edilen PVL pozitif suşların %80'inin DTA örneğinde, %20'sinin ise kan kültüründe ürediği görüldü.
- 2004 yılında izole edilen HK-MRSA suşları arasında PVL pozitif suş sayısı 9, 2005 yılında PVL pozitif suş sayısı 5 olarak bulundu. Bu veri hastanemizde PVL pozitif HK-MRSA infeksiyon insidansında bir artış olmadığını göstermekle birlikte kesin yorum yapabilmek için ardışık yılların verilerine ihtiyaç vardır.
- Hastanemizde iki yıl içinde izole edilen 110 MRSA suşu içinde, 68 suşta SCC*mec* III, 38 suşta SCC*mec* varyant IIIB, 3 suşta SCC*mec* IV saptandı. Bir suşta *mecA* geni pozitif olup, SCC*mec* tipi mevcut SCC*mec* tipleri arasında sınıflandırılmadı.
- MRSA suşlarının PFGE paternlerine göre 8 klon ayırt edildi (klon A, B, C, D, K, L, N, O). Tüm MRSA suşlarının %92.7'sinin, PVL pozitif suşların %79'unun klon A'ya ait olduğu saptandı.
- PVL negatif suşlarda siprofloksasin direnci %98, rifampisin direnci %92.7, gentamisin direnci %88.5, eritromisin direnci %66, klindamisin direnci %37,

TMP-SMX direnci %8; PVL pozitif MRSA suşlarda ise direnç oranları sırasıyla 92.8, %92.8, %85.7, %78.5, %50 ve %21.4 olarak belirlendi.

- Tüm MRSA suşlarının tigesiklin, vankomisin, teikoplanin ve linezolide duyarlı olduğu tespit edildi.

7. KAYNAKLAR

1. Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1968;2(7571):741-4.
2. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(1):9-17.
3. Calfee DP, Durbin LJ, Germanson TP, Toney DM, Smith EB, Farr BM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24(6):422-6.
4. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(11):7687-92.
5. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2240-4.
6. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):1955-63.
7. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002;359(9320):1819-27.
8. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist*. 2001;7(4):349-61.
9. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the

- management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(2):103-24.
10. Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: Los Angeles County, California, 2002-2003. *MMWR* 2003;52:88.
 11. Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):196-203.
 12. Payne MC, Wood HF, Karakawa W, Gluck L. A prospective study of staphylococcal colonization and infections in newborns and their families. *Am J Epidemiol.* 1965;82(3):305-16.
 13. Wadlvoegel FA. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2072-3.
 14. Martin MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the persistent resistant nosocomial pathogen. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1994;14:170-91.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.* M100-A15.. Wayne, PA, CLSI, 2005.
 16. Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol.* 1994;2(10):372-80.
 17. Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(5):479-89.
 18. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1984;158(2):513-6.
 19. de Lencastre H, de Jonge BL, Matthews PR, Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33(1):7-24.
 20. de Jonge BL, Tomasz A. Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin:

functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(2):342-6.

21. Rohrer S, Berger-Bachi B. FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):837-46.

22. Ornelas-Soares A, de Lencastre H, de Jonge B, Gage D, Chang YS, Tomasz A. The peptidoglycan composition of a *Staphylococcus aureus* mutant selected for reduced methicillin resistance. *J Biol Chem.* 199;268(35):26268-72.

23. Alborn WE Jr, Hoskins J, Unal S, Flokowitsch JE, Hayes CA, Dotzlaf JE, Yeh WK, Skatrud PL. Cloning and characterization of femA and femB from *Staphylococcus epidermidis*. *Gene.* 1996 Nov 21;180(1-2):177-81

24. Berger-Bachi B. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol.* 1994;2(10):389-93.

25. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 2003;6(1):41-52.

26. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science.* 2001;291(5510):1962-5.

27. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(2):67-74.

28. Inglis B, Matthews PR, Stewart PR. The expression in *Staphylococcus aureus* of cloned DNA encoding methicillin resistance. *J Gen Microbiol.* 1988;134(6):1465-9.

29. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(1):85-92.

30. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):781-91.

31. Olsson-Liljequist B, Larsson P, Ringertz S, Lofdahl S. Use of a DNA hybridization method to verify results of screening for methicillin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993;12(7):527-33.

32. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1549-55.
33. Lim TT, Chong FN, O'Brien FG, Grubb WB. Are all community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related? A comparison of their mec regions. *Pathology*. 2003;35(4):336-43.
34. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5):1323-36.
35. 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(9538):874-85.
36. Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):2070-83.
37. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2637-51.
38. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*. 2002;186(9):1344-7.
39. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(4):1147-52.
40. Benner EJ, Kayser FH. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1968;2(7571):741-4.

41. Townsend DE, Ashdown N, Bolton S, Bradley J, Duckworth G, Moorhouse EC, Grubb WB. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*. 1987;9(1):60-71.
42. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13(1):50-5.
43. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis*. 2004;39(6):776-82.
44. Fishbain JT, Lee JC, Nguyen HD, Mikita JA, Mikita CP, Uyehara CF, Hospenthal DR. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a blinded study to establish baseline acquisition rates. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24(6):415-21.
45. Reboli AC, John JF Jr, Platt CG, Cantey JR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak at a Veterans' Affairs Medical Center: importance of carriage of the organism by hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1990;11(6):291-6.
46. Boyce JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Detection, epidemiology, and control measures. *Infect Dis Clin North Am*. 1989;3(4):901-13.
47. van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A, Vandembroucke-Grauls C, van den Brule A, Koeleman H, et al. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1995;33(6):1537-47.
48. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1994;32(2):407-15.
49. Cetinkaya Y, Kocagoz S, Hayran M, Uzun O, Akova M, Gursu G, Unal S. Analysis of a mini-outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical ward by using arbitrarily primed-polymerase chain reaction. *J Chemother*. 2000 Apr;12(2):138-44.
50. Dr.Gülşen Özkaya Şahin. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde MRSA suşlarının moleküler karakterizasyonu. Uzmanlık tezi. 2002
51. Shopsis B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, Krasinski K,

Kornblum J, Alcabes P, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis.* 2000;182(1):359-62.

52. Charlebois ED, Bangsberg DR, Moss NJ, Moore MR, Moss AR, Chambers HF, Perdreau-Remington F. Population-based community prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the urban poor of San Francisco. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):425-33.

53. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis.* 2003;36(2):131-9.

54. Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, Groom AV, Steward CD, Johnson SK, Besser JM, O'Boyle C, Danila RN, Cheek JE, Osterholm MT, Moore KA, Smith KE. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):990-6.

55. Buckingham SC, McDougal LK, Cathey LD, Comeaux K, Craig AS, Fridkin SK, Tenover FC. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(7):619-24.

56. Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(6):602-7.

57. 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. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):978-84.

58. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 2002;35(7):819-24.

59. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis.* 2003;36(2):131-9.

60. Said-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(6):451-5.
61. Adcock PM, Pastor P, Medley F, Patterson JE, Murphy TV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. *J Infect Dis.* 1998;178(2):577-80.
62. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA.* 1998;279(8):593-8.
63. CDC. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR* 1999;48:707-10.
64. Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, Moore KA, Cheek JE. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA.* 2001;286(10):1201-5.
65. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(3):180-9.
66. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(5):275-86.
67. Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2080-4.
68. Saiman L, O'Keefe M, Graham PL 3rd, 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. *Clin Infect Dis.* 2003;37(10):1313-9.
69. Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, Krasinski K, Kornblum J, Alcibes P, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Prevalence of

methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis.* 2000;182(1):359-62.

70. Jernigan JA, Pullen AL, Flowers L, Bell M, Jarvis WR. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant

Staphylococcus aureus at the time of hospital admission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(6):409-14.

71. Dietrich DW, Auld DB, Mermel LA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England children.

Pediatrics. 2004;113(4):e347-52.

72. Shahin R, Johnson IL, Jamieson F, McGeer A, Tolkin J, Ford-Jones EL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a child care center following a case of disease. Toronto Child Care Center Study Group. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999;153(8):864-8.

73. Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(1):82-4.

74. Regev-Yochay G, Rubinstein E, Barzilai A, Carmeli Y, Kuint J, Etienne J, Blech M, Smollen G, Maayan-Metzger A, Leavitt A, Rahav G, Keller N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(3):453-6.

75. Eckhardt C, Halvosa JS, Ray SM, Blumberg HM. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit from a patient with community-acquired disease.

Infect Control Hosp Epidemiol. 2003;24(6):460-1.

76. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurst JR, Carroll K, Thomas DL, Nuermberger E, Bartlett JG. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Pantone-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis.* 2005;40(1):100-7.

77. Gonzalez BE, Martinez-Aguilar G, Hulten KG, Hammerman WA, Coss-Bu J, Avalos-Mishaan A, Mason EO Jr, Kaplan SL. Severe *Staphylococcal* sepsis in

- adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics*. 2005;115(3):642-8.
78. Boussaud V, Parrot A, Mayaud C, Wislez M, Antoine M, Picard C, Delisle F, Etienne J, Cadranet J. Life-threatening hemoptysis in adults with community-acquired pneumonia due to Panton-Valentine leukocidin-secreting *Staphylococcus aureus*. *Intensive Care Med*. 2003;29(10):1840-3.
79. Maltezou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(2):87-96.
80. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100S-16. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 Wes Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA, 2006.
81. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY, Preston DA, Skatrud PL. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 Jul;30(7):1685-91.
82. 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. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128-32.
83. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2155-61.
84. Goering RV, Fey PD, Goldstein FW. Usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to teicoplanin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14 Suppl 1:S3-5
85. 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(22):2976-84.
86. Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(3):455-62.

87. Topeli A, Unal S, Akalin HE. Risk factors influencing clinical outcome in *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a Turkish University Hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Feb;14(1):57-63.
88. Khairulddin N, Bishop L, Lamagni TL, Sharland M, Duckworth G. Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia among children in England and Wales, 1990-2001. *Arch Dis Child*. 2004;89(4):378-9.
89. National Public Health Service for Wales. *Staphylococcus aureus* Bacteraemia Surveillance Report. Specialty Data. <http://www.wales.nhs.uk/sites/page.cfm?orgid=379&pid=5362> (28 June 2005, date last accessed).
90. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Tiemersma E, Willems RJ, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Etienne J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3341-5.
91. Vandenesch F, Etienne J. How to prevent transmission of MRSA in the open community? *Euro Surveill*. 2004;9(11):5.
92. Ben Nejma M, Mastouri M, Frih S, Sakly N, Ben Salem Y, Nour M. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;55(1):21-6.
93. Berglund C, Molling P, Sjoberg L, Soderquist B. Predominance of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCCmec types with Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(6):447-56.
94. Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):1083-5.
95. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(1):29-34

96. Unal S, Akova M, Uzun Ö, Akalin H, Kocagöz S, TUBITAK Project Collaborative Centers. Methicilline resistance in staphylococci in Turkey: 1776 strains, a multicenter study. (Bildiri Ö no:2294). 20th International Congress of Chemotherapy, Sydney, Avusturalya, 29 Haziran-3 Temmuz, 1997.
97. Boyce JM, Cookson B, Christiansen K, Hori S, Vuopio-Varkila J, Kocagoz S, Oztop AY, Vandenbroucke-Grauls CM, Harbarth S, Pittet D. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(10):653-63.
98. Kocagöz S, Gür D, Uzun Ö, Akova M. Resistance to methicillin of *Staphylococcus* in Turkey. 8th Turkish Microbiology and Infectious Diseases Congress; Antalya, Turkey, Oct 6-7, 1997. Abstract 776.
99. Unal S. Hospital infections: where are we? *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2004;8:129-31.