

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA PANTON-
VALENTIN LÖKOSİDİN TOKSİNİNİN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR D. YİĞİT

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. MELEK DEMİR**

DENİZLİ-2013

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA PANTON-
VALENTIN LÖKOSİDİN TOKSİNİNİN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ÖZGÜR D. YİĞİT**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. MELEK DEMİR**

**Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 26.07.2011 tarih ve
2011TPF030 nolu kararı ile desteklenmiştir.**

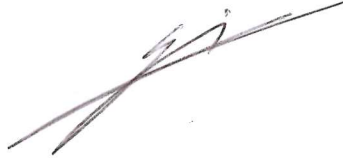
DENİZLİ-2013

Doç. Dr. Melek DEMİR danışmanlığında Dr. ÖZGÜR D. YİĞİT tarafından yapılan “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentin lökosidin toksininin polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması” başlıklı tez çalışması 11/04/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof.Dr. İlknur KALELİ



ÜYE: Prof.Dr. Çağrı ERGİN



ÜYE: Doç.Dr. Melek DEMİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. .../ .../.

Prof. Dr.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan v.

Prof.Dr.Ali İhsan BOZKURT
Dekan V.

TEŐEKKÖR

Eğitimimde çok emeği olan ve desteğini esirgemeyen tez danıŐmanım Sayın Doç.Dr. Melek Demir başta olmak ũzere uzmanlık ũđrenciliđim sũresince sonsuz katkısı bulunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında gŕevli ũđretim ũyeleri Prof.Dr. İlknur Kaleli, Prof.Dr. ağrı Ergin, Doç.Dr. Nural Cevahir, Yrd.Doç.Dr. Mustafa Őengũl, Yrd.Doç.Dr Ergun Mete'ye; tezimin fotoğraflama aŐamasında emeği geçen Tıbbi Biyoloji ũđretim ũyesi Yrd.Doç.Dr. Yavuz Dodurđa'ya; kontrol suşlar için Doç.Dr. Bũlent Bozdoğan'a, tez çalıŐmam boyunca her zaman yanımda olan aileme, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen asistan arkadaŐım AraŐ.Gŕr.Dr. Osman Acar'a; asistan arkadaŐlarıma; Tıbbi Mikrobiyoloji AD.'nın tũm çalıŐanlarına sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|------|
| ONAY SAYFASI..... | III |
| TEŞEKKÜR | IV |
| İÇİNDEKİLER | V |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | IX |
| TABLolar DİZİNİ | XI |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | XII |
| ÖZET..... | XIII |
| SUMMARY | XIV |
| GİRİŞ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| STAFİLOKOKLAR | 3 |
| <i>S. AUREUS</i> | 4 |
| Morfoloji ve Boyanma Özellikleri... .. | 4 |
| Kültür Özellikleri | 4 |
| Biyokimyasal Özellikleri..... | 4 |
| Hücre Yapısı | 5 |
| <i>Kapsül</i> | 5 |
| <i>Hücre Duvarı</i> | 5 |
| Virulans Faktörleri | 7 |

| | |
|--|----|
| Enzimler | 7 |
| <i>Katalaz</i> | 7 |
| <i>Koagülaz</i> | 7 |
| <i>Lipaz</i> | 8 |
| <i>Hyalüronidaz</i> | 8 |
| <i>Stafilokinaz</i> | 8 |
| <i>Deoksiribonükleaz (DNase)</i> | 9 |
| <i>Fosfatidilinozitol - spesifik fosfolipaz C</i> | 9 |
| <i>Penisilinaz (Beta- Laktamaz)</i> | 9 |
| Toksinler | 9 |
| <i>Alfa Toksin</i> | 10 |
| <i>Beta Toksin</i> | 10 |
| <i>Delta Toksin</i> | 11 |
| <i>Gama Toksin ve PVL</i> | 11 |
| <i>Panton- Valentin Lökosidin(PVL = non hemolitik lökosidin)</i> | 11 |
| <i>Enterotoksin</i> | 14 |
| <i>Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin)</i> | 14 |
| <i>Toksik Şok Sendromu Toksini -1</i> | 14 |
| Slime Faktör | 15 |
| S. AUREUS HASTALANDIRICILIK ÖZELLİKLERİ VE İMMÜNİTE | 16 |
| S. AUREUS ENFEKSİYONLARI | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları | 18 |
| Solunum Sistemi Enfeksiyonları..... | 19 |
| Haşlanmış Deri Enfeksiyonu..... | 19 |
| Toksik Şok Sendromu..... | 19 |
| Besin Zehirlenmesi | 19 |
| ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI..... | 20 |
| METİSİLİN DİRENCİ ve STAFİLOKOKAL KASET KROMOZOM..... | 21 |
| Penisilin Direnci | 21 |
| <i>Kromozomal (İntrinsik) Metisilin Direnci.....</i> | <i>22</i> |
| <i>Aşırı miktarda Beta Laktamaz Salgılanması.....</i> | <i>23</i> |
| <i>PBP'lerdeki yapısal değişiklikler</i> | <i>23</i> |
| Stafilokokal Kaset Kromozom <i>mec</i> (SCC<i>mec</i>)..... | 24 |
| GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |
| SUŞLARIN İZOLASYONU VE SAKLANMASI | 27 |
| ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞIN SAPTANMASI..... | 27 |
| METİSİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASI | 27 |
| Disk Difüzyon Yöntemi | 27 |
| Oksasilin Tuz Agar Tarama Testi | 28 |
| BAKTERİYEL DNA' NIN EKSTRAKSİYONU..... | 28 |
| Mec A GENİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI..... | 29 |
| PVL GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| SCCMec GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI..... | 33 |
| BULGULAR..... | 36 |
| TARTIŞMA..... | 48 |
| SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 61 |
| KAYNAKLAR..... | 63 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMC : Amoksisilin-klavulonat

AZM: Azitromisin

BORSA : Borderline Resistant *Staphylococcus aureus*

C: Kloramfenikol

CCR : Casette Chromosome Recombinase

CIP : Siprofloksasin

CLSI : Clinical and Laboratory Standarts Institute

CN: Gentamisin

CTX: Sefotaksim

ETA-ETB: Eksolyatif toksin A-B

HK-MRSA : Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

ME: Meropenem

MODSA : Modified Resistant *Staphylococcus aureus*

MRSA : Metisilin Resistan *Staphylococcus aureus*

MSSA : Metisilin Sensitif *Staphylococcus aureus*

MSCRAMM: Microbial surface component reacting with adherence matrix molecules

NAG : N-asetil glukozamin

NAM : N-asetil muramik asit

ORF : Open Reading Frame

P: Penisilin

PBP : Penisilin Bağlayan Protein

PBP2A: Penisilin Bağlayan Protein 2A

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PMNL : Polimorfonükleer Lökositleri

PVL : Panton-Valentine Lökosidin

RA: Rifampisin

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SCC : Staphylococcal Cassette Chromosome

TE: Tetrasiklin

TEC: Teikoplanin

TMP- SXT : Trimetoprim- Sulfametoksazol

TK-MRSA : Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

VA: Vankomisin

Kbç : Kilobaz çifti

Bç : Baz çifti

TABLolar DİZİNİ

| | | Sayfa No |
|-----------------|--|----------|
| Tablo 1 | SCC <i>mec</i> tiplendirmesi için multipleks PCR gen bölgeleri. | 35 |
| Tablo 2 | MRSA ve MSSA suşlarının gönderildiği bölümlere göre dağılımı. | 36 |
| Tablo 3 | MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri yara ve yara-dışı örneklere göre dağılımı. | 37 |
| Tablo 4 | MRSA ve MSSA suşlarının yatan ve ayakta izlenen hastalardaki dağılımı. | 37 |
| Tablo 5 | Yatan ve ayakta izlenen hastalardan izole edilen MRSA ve MSSA suşlarının antibiyotik direnç dağılım tablosu. | 38 |
| Tablo 6 | SCC <i>mec</i> tiplerinin <i>MecA</i> pozitif suşlardaki dağılımı. | 41 |
| Tablo 7 | SCC <i>mec</i> tiplerinin yatan ve ayakta izlenen hasta suşlarındaki dağılımı. | 41 |
| Tablo 8 | SCC <i>mec</i> tiplerinin izole edildikleri örneklere göre dağılımı. | 42 |
| Tablo 9 | SCC <i>mec</i> tiplerine göre antibiyotik direnç oranları. | 43 |
| Tablo 10 | PVL(+) MRSA ve MSSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. | 46 |
| Tablo 11 | SCC <i>mec</i> Tip IV saptanan suşların antibiyotik direnç profili. | 47 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | Sayfa No |
|----------------|--|-----------------|
| Şekil 1 | MRSA suşlarında <i>Mec A</i> genlerinin PCR jel görüntüleri | 39 |
| Şekil 2 | MRSA suşlarının SCC <i>mec</i> tiplerinin PCR jel görüntüleri | 40 |
| Şekil 3 | MRSA suşlarının SCC <i>mec</i> tiplerinin PCR jel görüntüleri | 40 |
| Şekil 4 | Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 55 °C bağlanma sıcaklığındaki PCR jel görüntüleri | 44 |
| Şekil 5 | Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 58 °C bağlanma sıcaklığındaki PCR jel görüntüleri | 45 |
| Şekil 6 | Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 55 °C ve 58 °C bağlanma sıcaklıklarındaki ampliconların eş zamanlı PCR jel görüntüleri | 45 |
| Şekil 7 | <i>PVLup</i> ve <i>PVLdn</i> primerleri ile 48 °C ve 50 °C bağlanma sıcaklıklarındaki ampliconların eş zamanlı PCR jel görüntüleri | 47 |

ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentin lökositin toksininin polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması

Dr. Özgür Döne YİĞİT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) insanlarda en sık görülen enfeksiyon etkenlerinden birisidir. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden birisi de metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'tur. Günümüzde metisilin direncine yol açan *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Stafilokokların virülansta rol oynayan çeşitli enzim, hemolizin ve toksinleri bulunmaktadır. Bunlar içerisinde bulunan Panton-Valentine Lökositin (PVL), şiddetli akciğer ve cilt enfeksiyonuyla ilişkili bir sitotoksin olup virülansta önemli bir role sahiptir.

Bu çalışmada yara ve yara dışı çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında, *mecA*, PVL gen varlığının ve staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) tiplerinin araştırılması ve yatan/ayaktan izlenen hastalardan izole edilen suşlar arasındaki farklılığın ortaya konması amaçlanmıştır.

Aralık 2010 ile Nisan 2012 tarihleri arasında, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen yara ve yara dışı örneklerden izole edilen, 65 MRSA ve 135 MSSA suşu çalışmaya dahil edildi. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* geninin saptanması ve PVL varlığı PCR, SCC*mec* olarak isimlendirilen mobil genetik elemente göre tiplendirme multiplex PCR yöntemi kullanılarak yapıldı.

Çalışmaya alınan 65 MRSA suşunun 4'ünde *mecA* geni saptanmadı. 61 *mecA* (+) MRSA suşunun 37 (60.7)'si SCC*mec* Tip III olarak saptandı. Toplam 200 adet *S. aureus* suşu arasında 2 (%1) suş PVL pozitif olarak tespit edildi. PVL pozitif saptanan suşların ikisi de ayaktan izlenen hastaların yara örneklerinden izole edilmiştir. Yara örneğinden izole edilen MRSA suşunun SCC*mec* Tip IV ve PVL pozitif saptanması önemli bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, *mecA*, MRSA, PVL, SCC*mec*.

SUMMARY

Investigation of Panton-Valentine leukocidin toxin by using polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains which are isolated from various clinical samples.

Dr. Özgür Döne YİĞİT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the most common infectious agent in humans. Methicillin resistant *S.aureus* (MRSA) is especially one of the most important factors of nosocomial infections. Today, detecting *mecA* gene, which causes methicillin resistance, by molecular methods is considered to be the gold standard. *Staphylococcus* have various enzymes, hemolysins and toxins that play a role in virulence. Panton-Valentine leukocidin (PVL) in them is a cytotoxin associated with severe lung and skin infection and also plays an important role in virulence.

In this study, it is aimed to determine the difference between the strains isolated from patients and to investigate Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) types and the existence of *mecA*, PVL genes in *S. aureus* strains that are isolated from wound and the other clinical samples.

Between December 2010 and April 2012, in Pamukkale University Medical Faculty Hospital, Laboratory of Medical Microbiology, 65 MRSA and 135 MSSA strains isolated from wound and the other clinical samples are included in the study. Detection of the *mecA* gene responsible for methicillin resistance is examined by PVL existence and PCR, typology, which is called as SCC*mec* is done according to mobile genetic element and using multiplex PCR method.

MecA gene was not detected in 4 out of 65 MRSA strains in the study. 37 (60.7%) *mecA* positive MRSA strains out of 61 is detected as SCC*mec* type III. Among 200 *S. aureus* strains, 2 (1%) of them were identified as PVL positive. Both PVL-positive strains were detected from outpatients and isolated from the wound. The detection of SCC*mec* type IV and PVL-positivity in MRSA strain isolated from wound sample was significant.

Keywords: Antibiotic Resistance, *mecA*, MRSA, PVL, SCC*mec*.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), insanlarda en sık görülen enfeksiyon etkenlerinden birisidir. *S. aureus*, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından, yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara kadar farklı klinik tablolara neden olabilmektedir.

Antimikrobiyal tedavi ile *S. aureus*'a bağlı mortalite oranlarını oldukça düşürülmesine rağmen, antimikrobiyallere karşı hızlı direnç gelişimi nedeniyle, sadece hastane kökenli değil, toplum kökenli *S. aureus* suşlarının yol açtığı enfeksiyonlarda da ciddi sağlık sorunları görülmektedir. Bu suşlar ile oluşan enfeksiyonların kontrolü ve uygun tedavileri, toplum ve hastane kaynaklı *S. aureus* suşlarının oluşturdukları enfeksiyonların patogenezinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasına ve moleküler yöntemlerle kökenlerinin doğru tanımlanmasına ve tiplendirmelerine bağlıdır (1-4).

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. MRSA'larda tüm beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere, aynı zamanda beta-laktam dışı antibiyotiklere de olmak üzere çoklu ilaç direnci görülmektedir. Metisilin direncinin en kısa zamanda doğru olarak saptanmasının bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önemi vardır. Günümüzde metisilin direncine yol açan *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir (5, 6).

Panton-Valentin Lökositidin (PVL), şiddetli akciğer ve cilt enfeksiyonuyla ilişkili bir sitotoksindir (7). MRSA enfeksiyonları toplumdaki sağlıklı bireyler arasında yaygın görülme de son yıllarda MRSA'nın yeni suşları ile toplumda deri enfeksiyonu salgını ve şiddetli pnömoni olguları bildirilmiştir. PVL toksini, metisilin direncini kodlayan *SCCmec* TipIV kaset varlığı ve beta laktamlar dışındaki antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olmaları bu suşların ortak özellikleri olarak tanımlanmıştır (7). PVL toksin varlığı MRSA izolatlarının toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) olduğuna işaret etmektedir. Ciddi TK-MRSA enfeksiyonları ve buna bağlı mortalitenin artışı PVL geni taşıyan *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasının önemli olduğunu göstermektedir (8).

TK-MRSA izolatlarının bir kısmı *mecA* genini taşımalarına rağmen metisilin için minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değerleri çok düşük olabilmektedir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde yanlışlıkla metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle PVL pozitif MSSA izolatlarında *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile belirlenmesi önerilmektedir (8).

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yara ve yara dışı çeşitli klinik örnekten izole edilen *S. aureus* suşlarında, fenotipik olarak antibiyotik duyarlılıklarının, moleküler olarak *mecA*, PVL gen varlığı, SCC*mec* tiplerinin araştırılması, yatan ve ayaktan izlenen hastalardan izole edilen suşlar arasındaki farklılığın ortaya konması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

STAFİLOKOKLAR

İnsan ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açabilen stafilokoklar, ilk olarak 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1880 yılında Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. Aynı yılda İskoçyalı cerrah Alexander Ogston, fare ve kobaylarda etkenin patojen olduğunu vurgulamış ve *Staphylococcus* adını kullanmıştır (9).

Staphylococcus cinsi, *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alır. Bu ailede *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus* ve *Staphylococcus* olmak üzere 4 cins yer almaktadır. *Planococcus* cinsi hareketli, gram-pozitif koklardan oluşur ve insanlardan izole edilmemiştir. *Micrococcus* türleri ise genellikle laboratuvar kontaminantı olarak izole edilirler. *Stomatococcus mucilaginosus*, insan ağız florasının normal bir üyesidir ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda nadiren bildirilmektedir. *Staphylococcus* cinsinde yer alan türler ise belirgin insan patojenleridir ve yüzeysel cilt enfeksiyonlarından, hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar çok geniş bir spektrumda hastalıklara neden olmaktadır. DNA'daki G+C oranları, genom yapıları ve hücre duvar yapıları arasında farklılıklara rağmen, nükleik asit hibridizasyon deneyleri ve 16S rRNA sekanslarının incelenmesi sonucunda bu dört cins aynı aile içerisinde toplanmıştır (10, 11).

Staphylococcus cinsi içerisinde çoğu insanlarda bulunabilen 40 tür ve 24 alt tür yer almaktadır. İnsanlarda enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen türler *S. aureus* (en virulan ve en iyi bilinen tür), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*), *Staphylococcus lugdunensis* (*S. lugdunensis*), *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) ve *Staphylococcus schleiferi* (*S. schleiferi*) dir (7, 10, 11).

S. AUREUS

Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

S. aureus 0.5-1.5 µm çapında, üzüm salkımı şeklinde topluluklar oluşturan kok morfolojisinde, sıvı besiyerinde diplokok veya kısa zincir şeklinde görülebilen sporsuz, hareketsiz mikroorganizmalardır. Bazı boyalarla kolay boyanırlar ve gram pozitiflerdir. Genellikle kapsülsüz olmakla birlikte nadiren kısıtlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler (12).

Kültür özellikleri

S. aureus, geniş bir ısı aralığında (6.5-45 °C) üreyebilen, aerob ve fakültatif anaerob bakterilerdir. Optimal üreme ısısı 30-37 °C ve pH: 7-7.5'tir. Basit besiyerinde üreseler de, kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve griden tipik altın sarısına kadar değişen pigment oluştururlar. Pigment oluşumu için en iyi ısı 20-25 °C'dir. Katı besiyerinde yuvarlak kenarlı, parlak, kabarık, S tipinde ve 2-4 mm çapında koloniler oluşturur. Isıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Çoğu %7.5-10 NaCl içeren besiyerinde, 18-45 °C'de kolaylıkla üreyebilmektedir. *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* diğer türlerin aksine anaerob ortamda üremektedir. Ancak anaerobik ortamda ve sıvı besiyerinde pigment oluşumu gözlenmemektedir. Kanlı besiyerinde kolonilerinin etrafında değişik derecelerde hemoliz yaparlar (12-14).

Biyokimyasal özellikleri

S. aureus katalaz ve koagülaz pozitifdir, katalaz enzimi yardımıyla hidrojen peroksidi (H₂O₂) su ve oksijene parçalar. Ekstraselüler bir proenzim olan koagülaz plazmada 'coagulase releasing factor' ile birleşerek aktifleşir ve plazmanın pıhtılaşmasına kadar giden bir dizi reaksiyon başlatır. Bu şekilde mikroorganizmanın çevresini saran kalın fibrin tabakası oluşur ve bu tabaka yardımıyla bakteri konak savunma sisteminin fagositozundan korunmuş olur. İnvazif patojenitenin bir göstergesi olan, serbest ve bağlı (clumping factor, kümeleştirici faktör) olmak üzere iki çeşit koagülaz vardır. Bu koagülazların sonuçları aynı olmakla birlikte antijenik yapı, etki mekanizmaları ve saptanma yöntemleri farklıdır (12, 13).

Oksidaz negatif, hemoliz pozitif bakterilerdir. Karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sükröz ve laktozu fermente eder, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu etkilemezler. Nitratları nitritlere indirger. Mannitolü parçalayarak asit oluştururlar. Koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan en önemli testlerden biri Mannitol testidir. Lizozim ve basitrasine dirençli olup furazolidon ve lizostafine duyarlıdır. Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturabilir (14, 10, 15).

Hücre yapısı

Genomu yaklaşık 2000-3000 kbç bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Stafilokokların DNA'larındaki G+C oranı % 30-39 moldür (16, 17). *S. aureus* genomunun, yaklaşık 2500 geni kodladığı düşünülmektedir (16).

Kapsül

Genellikle kapsülsüz olup nadiren sınırlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde infekte kalp pillerinde, periton ve intravenöz kateterlerden üretilen *S. aureus* suşlarında kapsül yapısı gösterilmiştir. Özellikle *S. aureus*'un mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bakteriye fagositozdan korur ve konak hücrelerine, kateterler gibi yabancı cisimlere yapışmayı kolaylaştırır. Stafilokoklarda 11 mikrokapsül polisakkarit serotipi tanımlanmıştır. *S. aureus* suşlarının % 70-80'ninde Tip 5 ve Tip 8 kapsül serotiplerine rastlanmıştır. Bu serotiplerin biyolojik farklılıklarının invivo ortamda virülans özelliklerini etkilediği ve Tip 5 serotipinin virülansının daha fazla olduğu görülmüştür (15, 18).

Hücre Duvarı

S. aureus'un hücre duvarı; peptidoglikan tabaka, teikoik asit, protein A ve diğer yüzey proteinleri olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (10).

Peptidoglikan tabaka, *S. aureus* hücre duvar yapısının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Peptidoglikan tabakanın polisakkarit iskeleti; birbirine $\beta(1-4)$ bağlarıyla bağlı, tekrarlayan N-Asetil Glikozamin (NAG) ve N-Asetil Muramik asit (NAM) birimlerinden oluşmaktadır (10). NAM'a bağlı D ve L aminoasitler sırasıyla

L-alanin, D-glutamin, L-lizin ve D-alanin tetrapeptid zinciri oluştururlar. Tetrapeptid zincirdeki L-lizin, stafilokoklar ve streptokoklar için tipiktir. Birçok mikroorganizmada ve gram negatif mikroorganizmalarda L-lizin yerine diaminopimelik asit bulunur (19).

Peptidoglikan tabakanın makrofajlardan sitokin salınımını uyardığı belirtilmektedir. Komplemanın aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olan peptidoglikan tabaka ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmalarına neden olur. Stafilokoklardaki pentaglisin köprüleri lizostafin enzimine ve peptidoglikan tabakanın β 1-4 bağları, ter, gözyaşı ve lökositlerde bulunan lizozim (muramidaz) enzimine duyarlıdır (10, 16, 19-21).

Peptidoglikan tabakanın sentezinde transglukozilaz, disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarında; transpeptidaz, pentapeptid köprüler oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasında ve D-karboksipeptidaz ise pentapeptid yapı içindeki son D-alaninin zincirden ayrılmasında rol alır. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksipeptidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. İnhibisyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere bağlanması sonucu geliştiğinden bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir. *S. aureus*'ta PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 olmak üzere dört tane PBP vardır (19-21).

Teikoik asit suda eriyebilen, antijenik yapıda, şeker-alkol-fosfat polimerleridir ve *S.aureus* hücre duvar ağırlığının %50'ye yakın bir kısmını oluşturur. *S. aureus*'un hücre duvarında aktif enzimlerin ve diğer proteinlerin bağlandığı yerdir. Ribitolteikoik asit ve lipoteikoik asit (Gliserol teikoik asit) olmak üzere iki tiptir. Lipoteikoik asit hücre membranından, Ribitolteikoik asit hücre duvarından uzanır. Lipoteikoik asitte, ribitolteikoik asitten farklı olarak poligliserol fosfat bulunmaktadır ve plazma membranındaki diaçilgliserol molekülleriyle bağlanarak bütünlüğün korunmasına yardımcı olur. Makrofaj ve diğer bağışıklık hücrelerinden sitokinlerin salınımını başlatarak inflamasyonda rol oynar (10, 19).

Hücre duvarının diğer önemli bir elemanı Protein A'dır. Sadece *S. aureus*'ta bulunan protein A, 42 kDa ağırlığında olup hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. İlk olarak 1940'da Wervey tarafından tanımlanmıştır. En önemli özelliği,

IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (10, 12).

Hücre duvarında Protein A dışında, Elastin, Kollajen, Fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleşme faktörü (clumping factor) de yüzey proteinleri olarak tanımlanmıştır. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında önemli faktörlerdir (10, 16, 19).

Virulans Faktörleri

S. aureus'un virülansında; kapsül, hücre duvar yapıları, yüzey proteinleri, toksinler, enzimler ve slime faktör rol almaktadır (12).

Enzimler

Katalaz

S. saccharolyticus ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında tüm stafilokokların sentezlediği enzimdir. Katalaz; toksik hidrojen peroksidi (H₂O₂), toksik olmayan oksijen ve suya dönüştürür. Katalaz enzimi, fagozom içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye karşı korunma sağlar (10).

Koagülaz

Ekstrasellüler bir proenzim olan koagülaz plazma pıhtılaşma proteindir. Koagülaz reaktif faktör ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırımını sağlar. Filtrelerden geçebilen, ısıya dirençli bir enzimdir. İki tip koagülaz bulunur; serbest koagülaz ve bağlı (clumping factor) koagülaz. Bunlar; fibrinojeni fibrine direkt olarak dönüştüren bağlı koagülaz ve bu dönüşümü serumdaki koagülaz reaktif faktör yardımıyla yapabilen serbest koagülazdır. Serbest koagülaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Bağlı koagülaz stafilokokların kümeleşmelerini de sağlar. Bu enzimlerin farklı mekanizmalarla plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir. Koagülaz pozitif stafilokokların, girdikleri organizmada fibrin bir zırh ile kaplanarak fagositoza karşı korundukları gibi aynı zamanda serumun bakterisit etkisini de

önleyerek patojeniteye katkı yaptığı bildirilmiştir. Koagülaz enzimi lamda ve tüpte koagülaz olmak üzere 2 şekilde araştırılmaktadır. (10, 12, 22, 23). Lam testi ile stafilokokların yüzeylerinde bağlı bulunan koagülaz saptanmaktadır. *S. aureus* suşlarının çoğunda bağlı koagülaz pozitifdir. Lam koagülaz testi negatif olan suşlara mutlaka tüp koagülaz testi yapılmalıdır. Çünkü bağlı koagülaz üretmeyen suşlar serbest koagülaz üretebilir ve tüp koagülaz testi ile serbest koagülaz saptanabilir. *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* ve *Staphylococcus schleiferi supsp. coagulans* gibi bazı hayvan suşları da tüp koagülaz pozitif olabilir. *Staphylococcus lugdunensis* ve *Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi* gibi serbest koagülaz üretmeyen suşlar bağlı koagülaz üretebilir ve lam testi pozitif olabilir. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilir. Böyle durumlarda ayırıcı testlerden birisi olan DNAz testi yardımcı olabilir. *S. aureus* hem DNAz, hem de *nuc* geni tarafından kodlanan termostabil nükleaz üretebilir (10).

Her iki test için de EDTA'lı tavşan plazmasının kullanılması önerilmektedir. *S. aureus* tanımlaması için tüp koagülaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir (10).

Lipaz

Lipaz enzimi lipitleri hidrolize eder. *S. aureus*'un tüm suşları ve KNS'lerin %30'dan fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynar (12, 23).

Hyalüronidaz

S. aureus suşlarının %90'dan fazlası tarafından salgılanır. Hyalüronik asidi hidrolize ederek enfeksiyonun yayılımını kolaylaştıran bir enzimdir. 'Yayılma faktörü' olarak da bilinir (12).

Stafilokinaz

Stafilokinaz 'Fibrinolizin' olarak da bilinir. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur ve fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur. Plazminojeni plazmine çevirir ve ısıya dirençlidir (23, 24).

Deoksiribonükleaz (DNase)

DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunan ısıya dirençli bir enzimdir (10).

Fosfatidilinozitol–spesifik fosfolipaz C

Özellikle erişkin tip respiratuar distres sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanmakla birlikte bu suşların penisilin başta olmak üzere antimikrobiyal ajanlara daha dirençli hale gelmesini sağlar (10).

Penisilnaz (Beta-laktamaz)

Penisilin grubu antibiyotiklerdeki β -laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir. Bunun sonucunda bakteriler hücre duvarı sentezini inhibe eden β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelirler. Bu enzimin salgılanmasını sağlayan genler, plazmid ve transpozonlarla aktarılır (23, 25). Penisilin ilk klinik kullanıma girdiği 1941 yılında stafilokoklar yüksek oranda penisiline duyarlı iken, ürettiği penisilnaz sayesinde bugün stafilokokların %90'ından fazlası penisiline dirençli durumdadır (7).

Toksinler

Toksin adını almalarının nedeni konak hücre yapısı ve fonksiyonlarını etkilemeleridir. Bazılarının etkileri enzimatik aktivitelerinden kaynaklanırken, enterotoksin ve toksik şok sendromu toksini gibi toksinler ise güçlü sitokin indikatörüdürler. *S.aureus*, sitolitik ya da membran eritici toksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentine lökositin), eksfoliyatif toksin (A ve B), enterotoksin ve toksik şok sendromu toksinini (TSST-1) üretebilmektedir. Sitolitik toksinler hemolizin olarak da adlandırılmaktadır. İlk dört toksinin etkileri sadece eritrositlerle sınırlı olmadığından ve Panton-Valentine Lökositin (PVL) eritrositleri etkilemediğinden tüm bu toksinlerin hemolizin olarak adlandırılmasının yanlış olduğu düşünülmektedir (16).

Sitotoksinler nötrofilleri eriterek, lizozomal enzimlerinin açığa çıkmasına ve etraflarındaki dokuların harabiyetine neden olur. Eksfoliatif toksin A, enterotoksinler ve TSST-1 süperantijen olarak adlandırılan bir polipeptid sınıfına dahildirler (16).

Süperantijenler makrofajlardaki MHC-2 (major histocompatibility complex 2) moleküllerine bağlanır. MHC-2 molekülleri spesifik olarak T-hücre reseptörlerinin beta alt birimine bağlanarak T-hücrelerinin proliferasyonuna ve doku hasarını başlatacak sitokinlerin salınımına neden olurlar (16).

S. aureus'lardan en sık izole edilen sitolitik toksinler Alfa, Beta, Delta ve Gama toksinlerdir (16).

Alfa Toksin

S. aureus'un birçok suşunun ürettiği alfa-toksin, kromozom ve plazmid tarafından kodlanabilen 33.000 Da ağırlığında polipeptidten oluşur. Bu toksin, kan damarlarındaki düz kasları parçalar. Eritrosit, lökosit, hepatosit, trombosit ve hücre kültürlerini de içeren birçok hücreye toksik etkisi vardır (7, 23).

Konak hücre membranının hidrofobik bölgelerine integre olur ve 1-2 nm'lik por oluşumuna neden olur. Potasyumun hızla dışarı çıkışı ve sodyum, kalsiyum, diğer küçük moleküllerin içeri girişi ile osmotik şişme ve hücre lizisi meydana gelir (7, 10).

Alfa toksin subkutanöz verildiğinde dermonekrotik etki yapar, hayvanlara intravenöz yolla verildiğinde ise ölüme neden olmaktadır. Koyun kanlı agarda üreyen bazı *S. aureus* kolonilerinin etrafında gözlenen eritrosit hemolizinden bu toksin sorumludur (10).

Beta Toksin

Yağ açısından zengin membranları hasara uğratan; Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan beta toksin, 35.000 Da molekül ağırlığında ısıya duyarlı proteinden oluşur. Substrat özgüllüğü sfingomyelin ve lizofosfatidilkolinle sınırlı olup hemolitik aktivite için magnezyum iyonları gerekir. Beta toksin, B grup streptokoklarca üretilen CAMP faktör ile birlikte, B grubu streptokokların tanısında kullanılan CAMP testinde gözlenen sinerjistik hemolizden sorumludur (7, 10).

Beta toksin koyun eritrositlerini parçalamasıyla gösterilebilir. Hemoliz reaksiyonunu görmek için koyun veya insan eritrositli buyyon ve agar plaklarının 37°C'deki inkübasyonunun ardından +4-20 °C'de bekletilmesi gerekir. Bu fenomen sıcak-soğuk lizisi olarak bilinir. Hemolizin-eritrosit karışımı 37°C inkübasyondan sonra düşük ıslalarda tutulursa lizis artar (26).

Stafilokokal enfeksiyonlarda doku harabiyeti ve abse oluşumunda alfa ve beta toksin birlikte rol oynar (7).

Delta toksin

Molekül ağırlığı 3000 Da'luk bir polipeptidden oluşur. Hücre membranında surfaktanı parçalayarak kalıcı membran hasarı yapar. Bu toksin *S. aureus* suşlarının %97'sinden fazlasında ve koagülaz negatif stafilokokların (KNS) %50-70'inde bulunur (10). Eritrositleri ve diğer hücreleri olduğu kadar, hücre içi membran yapılarını da etkileyen geniş spektrumlu sitolitik aktiviteye sahiptir (7).

Gama Toksin ve PVL

Gama toksin ve PVL ikibileşenli toksinlerdir. S (slow eluting proteins) ve F (fast eluting proteins) olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşurlar. 6 S protein (LukSPV, LukE, LukM, HlgA, HlgC, LukSI) ve 5 F protein (LukFPV, LukD, LukF'PV, HlgB, LukFI) tanımlanmıştır (27).

Bu toksinler nötrofil ve makrofaj lizisi ile hemolitik aktivite gösterirler. Por oluşumu ile permeabilite artışı ve osmotik geçirgenliğin bozulması sonucu hücre lizisi gerçekleşir (10).

Panton-Valentine Lökosidin (PVL = non hemolitik lökosidin)

İlk olarak 1894'te, Van de Velde tarafından bazı *S. aureus* suşlarının lökositleri parçalama yeteneğinden dolayı "lökosidin" adı verilmiştir. Van de Velde tarafından, *S. aureus*'un virulans özelliklerinin araştırıldığı çalışmada; köpek ve tavşanlarda plevral infeksiyon modeli geliştirilmiştir. Enjekte edilen *S. aureus* suşlarından birisinin lökositleri öldürdüğü belirlenen çalışmada lökosidin; 58°C'de 10 dakikada ısıtmakla inaktive olan albüminoid (protein) yapıda molekül olduğunu bununla birlikte bakteri sayısını ve hayvan ölümlerini artırdığı görülmüştür. Lökositlerin

lökosidine duyarlılığının ise türe bağımlı olduğu bildirilmiştir. Panton ve Valentine adındaki araştırmacılar tarafından, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıyla lökotosin arasındaki ilişki gösterilmiştir (28, 29).

Panton–Valentin Lökosidin (PVL), ekzotoksinlerin ‘synergohymenotropic’ ailesinin bir üyesidir. PVL, γ (Gama) –hemolizin homologundan biridir. γ -hemolizin *S. aureus* suşlarının %99’unda üretilirken PVL, %2-3’ünde üretilmektedir (27). γ -hemolizin kanlı agar besiyerlerinde agarın inhibitör etkisine bağılı olarak gösterilemez. PVL, inflamatuvar yanıtı γ -hemolizinler’den daha güçlü uyarmaktadır. γ -hemolizin ve PVL alt gruplarının tek başlarına hemolitik ve lökotosik aktiviteleri yoktur. İki farklı PVL proteini üç farklı γ -hemolizin ile kombinasyonlanır ve çift komponentli, altı farklı toksin meydana getirir. İkili gruplar oluşturduklarında; toksinlerin hepsi lökosit lizisine neden olurken, farklı derecelerde hemolitik aktiviteye sahip olurlar. Bu toksinler, *S. aureus*’un kromozomuna entegre olmuş profajlarla taşınmaktadır (14, 27).

PVL, birbiri ile sinerjik etkili, LukF (hızlı) ve LukS (yavaş) şeklinde adlandırılan iki proteinden oluşan bir toksindir. Her iki komponent te antijeniktir. S proteini, F proteinine göre, inflamatuvar yanıtı daha güçlü uyarmaktadır. Toksinin yapısını oluşturan bu proteinler elektroforezdeki hızlarına göre adlandırılmıştır. Elektroforezde hızlı olanına F (Fast), yavaş olanına S (Slow) adı verilmiştir. S ve F proteinleri, bakteriyofaj tarafından, *S. aureus* kromozomuna yerleşen *lukS*-PV ve *lukF*-PV adında iki gen tarafından kodlanır. Her iki bileşen de kristal özelliktedir (27).

LukS-PV ve *lukF*-PV, *S. aureus* genomunun iki bağımsız *ORF* bölgesini içeren *EcoRV* lokusunda yer almaktadır. *LukS*-PV gen bölgesi, 32 kDa molekül ağırlığında, 312 aminoasit ve 28 sinyal peptidi içermektedir. *LukF*-PV proteini ise moleküler ağırlığı 34 kDa, 325 aminoasit ve 24 sinyal peptidi içermektedir (27, 29).

PVL’nin S ve F komponentleri *S. aureus* tarafından ayrı olarak salgılanmaktadır. Başlangıçta *lukS*-PV bileşeni PMNL üzerine henüz bilinmeyen bir reseptöre bağlanır. *LukS*-PV bileşeni PMNL üzerine bağlandığında protein kinaz tarafından fosforile edilir ve Ca^{+2} kanalları aktive olur. Bu durum interlökin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin üretimi ve salınımı için tetik sinyali oluşturur. *LukF*-PV bileşeni *lukS*-PV üzerine bağlanarak dimer yapısı oluşur. Sonra sırasıyla *lukS*-PV ve

lukF-PV bileşenleri birbirleri üzerine bağlanarak heptamer (7'li) halka yapısı oluşur ve PMNL lizisi meydana gelir. Ortamda PVL konsantrasyonu fazla ise, hücre membranında porlar oluşturarak PMNL'ler lizise uğrarken, PVL konsantrasyonu az ise, mitokondri membranında por oluşturarak hücreyi apoptoza götürür (27, 29-32).

PVL, lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi olan bir *S.aureus* toksinidir. Diğer por oluşturan lökosidinlerin aksine Panton-Valentine Lökosidin (PVL) lökositler ve makrofajları etkilemesine rağmen eritrositleri etkilemez. Fagositozu etkileyerek virulansta önemli rol alır. İntradermal olarak Panton-Valentin Lökosidin enjekte edilmiş tavşanlarda, kapiller dilatasyon, kemotaksis, polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, polimorfonükleer karyorekzis ile deri ve doku nekrozunu da içeren ciddi inflamatuvar lezyonlar gözlenmiştir (33).

PVL, ilk olarak TK- MRSA izolatlarında saptanmıştır. PVL üreten TK-MRSA suşları üretmeyenlere göre daha ciddi enfeksiyonlara neden olurlar. PVL pozitif *S. aureus*; basit deri enfeksiyonundan, ciddi deri ve doku enfeksiyonlarına, nekrotizan pnömoni ve septisemiye kadar çeşitli hastalıklara neden olur. Özellikle çocuklarda, nekrotizan pnömoni nedenidir. Pnömonilerde yüksek ateş, lökopeni, plevral effüzyon, sepsis ve ölüm daha sık görülmektedir. Benzer şekilde deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoniye neden olan epidemik TK-MRSA suşlarının PVL pozitif olduğu da gösterilmiştir. PVL'nin patogenezdaki etkisi ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Ancak PVL'nin toksik etkisiyle lizise uğrayan lökositlerden açığa çıkan otolitik enzimler ve serbest oksijen radikallerinin doku nekrozunu meydana getirdiği düşünülmektedir (34-36).

Son yıllarda, PVL genlerinin TK-MRSA kökenlerinde yer alması dikkat çekicidir. TK-MRSA kökenlerinde küçük ve mobil stafilokokal kaset kromozom *mec* tipi (*SCCmec*) IV veya V vardır. Bu kaset tipini taşıyan *S. aureus* kökenlerinde, metisilin direncinin (*mecA*) yayılması, *SCCmec* tipleri I-III'den daha hızlı olduğu bildirilmiştir (37).

PVL'nin *S. aureus* enfeksiyonlarının patogenezisindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. PVL genlerinin yayılmasında TK-MRSA suşları suçlanmış ve tüm dünyada PVL pozitif *S. aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonlarında artış bildirilmiştir (28).

PVL geni ile ilgili yapılan çalışmalarda PVL %1.6 ile %100 arasında değişen oranlarda pozitif saptanmış olmasına rağmen ülkemizde ve yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda PVL pozitifliğine rastlanmamıştır (34, 38-42).

Enterotoksin

S. aureus suşlarının % 35-50'sinin oluşturabildiği saptanan bu toksin; ısıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksin; makrofaj ve T-helper hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim sisteminde süper antijen gibi davranır. A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere sekiz immünolojik tipi vardır. Besin zehirlenmelerinde sık karşılaşılan tipleri A ve D'dir (10, 20).

Belirli bir hayvan modeli bulunmadığından toksin aktivitesinin kesin mekanizması tam anlaşılamamıştır. Bu toksinler birer süperantijendir, T hücrelerinin ve sitokin salınımının nonspesifik aktivasyonuna neden olurlar. Midede epitelyum ve lamina propria altında nötrofil infiltrasyonu ve jejunumda fırçamsı kenar kaybı karakteristik histolojik değişikliklerdir. Mast hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımının, stafilokokal besin zehirlenmesinin özelliği olan kusmadan sorumlu olabileceği düşünölmektedir (7, 23).

Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)

Epidermolitik toksindir. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)'ndan ve stafilokokal enfeksiyonların eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki çeşittir. Eksfoliyatif toksin A; ısıya duyarlı ve plazmid orjinlidir. Eksfoliyatif toksin B; ise ısıya dirençli ve kromozom orjinlidir. Bu iki protein yapısal olarak farklı olmasına rağmen gösterdikleri biyolojik aktivite benzerdir (7, 10).

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST-1, 22.000 Da ağırlığında, ısı ve proteolizise dirençli, kromozomal kaynaklı bir ekzotoksindir. TSST-1; sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur.

Süperantijen gibi davranarak; T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır (7, 23).

TSST-1 düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerden sızıntıya neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etki yapar. TSST-1 vajina veya yara bölgesinden mukozal bariyerlere penetre olabildiği için Toksik şok Sendromunun (TSS) sistemik etkisinden sorumludur. TSS’da hipovolemik şokun neden olduğu çoklu organ yetmezliği nedeniyle ölüm oluşmaktadır. *S. aureus* suşlarının %5-25’i TSST-1 geni taşır. Son yıllarda KNS’lara bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir (7, 10, 23, 43).

Slime faktör

Slime üretimi stafilokoklarda önemli bir patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Slime, mikroorganizmanın konak hücreye veya yapay yüzeylere adezyonunu sağlayan bir yapıdır. Yüzeye adezyonda mikroorganizma ile yüzey arasındaki hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağları etkilidir. *S. aureus*’un matriks proteinlerine bağlanması sıkça bildirilmiştir. Konak matriks proteinlerine bağlanmada aracılık eden ve “MSCRAMM (mikrobiyal yüzey komponentini tanıyan adeziv matriks molekülleri)” olarak da adlandırılan adezinler; fibronektin, fibrinojen, elastin, osteopontin ve kolajene bağlanırlar (10, 12, 44).

S. aureus’un, vücut içine yerleştirilen cihazlara yapışması ilk aşamayı oluşturmaktadır. Biyofilm tabakası oluşuktan sonra kolonizasyon meydana gelmekte ve biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar sepsise yol açmaktadır. Slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup % 40 karbonhidrat, % 27 protein içermektedir. Çok kuvvetli antijenik yapıda olduğundan, tavşanlara enjekte edildiğinde çok yüksek titrede antikor cevabı elde edilir. Slime pozitif stafilokok suşlarının daha virülan ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slime faktör hücrel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (10, 12, 44, 45).

***S. AUREUS* HASTALANDIRICILIK ÖZELLİKLERİ ve İMMÜNİTE**

S. aureus suşlarında sitolitik veya membran hasarı yapan toksinler: Alfa, Beta, Delta, Gama ve Panton- Valentin Lökosidin (PVL), eksfoliyatif toksin, enterotoksin, Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) gibi birçok faktör virulans faktörü olarak tanımlanmıştır. Sitolitik toksinler, eritrosit ve nötrofil gibi hücrelerde lizis oluşturarak, enterotoksinler ve TSST-1 süperantijen özelliği göstererek hastalıkların oluşumunda önemli rol alırlar (10).

S. aureus suşlarının hastalandırıcılık özelliği virulans faktörleri yanında konağa bağlı predispozan faktörlere de bağlıdır. *S. aureus* enfeksiyonundan önce bakterinin konak hücrelerine kolonizasyonu gereklidir. Burun mukoza hücrelerine yapışma, teikoik asit ve diğer ligandlarla olur. *S. aureus* bütünlüğü bozulmuş deri, yabancı cisim ve endotel üzerinde bulunan fibrinojen, fibronektin, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, kemik siyaloproteini ve kollajene bakteri yüzeyindeki fibronektin bağlayan protein A ve B, kollajen bağlayan protein, elastin bağlayan protein ile bağlanır (46).

S. aureus mukoza veya epitel tabakasını bir şekilde geçince polimorfonükleer lökositler, monosit ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bakteriye bağlı peptidoglikan, teikoik asit ve protein A'nın uyarımı sonucu kompleman sistemi aktive olur. Bunun sonucunda oluşan kompleman C5a'nın etkisi ile fagositik hücrelerin bakterinin bulunduğu yere göçü gerçekleşir (10).

S. aureus'un fagositozu, spesifik IgG ve aktive olan kompleman sisteminin (C3b) opsonizasyonu ile artar. Bakteri tarafından üretilen hücre yüzeyinde bulunan aynı zamanda da serbest olarak ortama salınan protein A, IgG molekülünün Fc parçasına bağlanarak hem komplemanın harcanmasına yol açar; hem de bakteriye bağlanan IgG'ye fagositlerin bağlanmasına engel olur. Ayrıca bakteri yüzeyindeki protein A'ya Fc kısmıyla ters olarak bağlanan IgG'ler yüzeyi kaplayarak kompleman ve diğer spesifik IgG'lerin bakteri yüzeyine bağlanmasını engelleyici etki yaratır, nonspesifik ve spesifik immün mekanizmaları bozar. Vücutta bulunan yabancı cisimler (iv damar içi kateter, protez), stafilokok suşlarının ürettikleri polisakkarit yapıdaki slime tabakasına yatak oluşturarak ve slime tabakasının içine antimikrobiyal ajanların girmesini önleyerek enfeksiyon oluşumuna eğilimi artırır (46).

Konjenital lökosit kemotaksis defektinin görüldüğü Wiskott-Aldrich, Down, Job's ve Chediak-Higashi sendromu'nda ve diyabet, romatoid artrit hastalıklarında olduğu gibi kazanılmış lökosit kemotaksis defektleri stafilokok enfeksiyonlarına yatkınlığı artırır. Antikorlarla opsonizasyon defekti sonucu gelişen, konjenital veya kazanılmış hipogamaglobulinemiler ya da kompleman komponentlerinde eksiklik (özellikle C3 ve C5) stafilokok enfeksiyonları için predispozan faktörlerdir. Membrana bağımlı oksidaz defektlerinde fagozomlarda peroksidaz ve süperoksitin yokluğuna bağlı, fagositozu takiben bakterinin hücre içi öldürülmesinde bozukluk olan kronik granülamatöz hastalık ve lenfoblastik lösemi gibi hastalıklar da stafilokok enfeksiyonu gelişimine katkıda bulunur. Deri bütünlüğünün bozulması (cerrahi insizyon, egzema); yabancı cisim varlığı (dikiş, protez, damar içi kateter); alkolizm, malignensi gibi altta yatan kronik hastalıklar ve özellikle virüsler olmak üzere diğer etkenlerle enfeksiyonlar stafilokok enfeksiyonlarına yatkınlığı artıran faktörlerdir (46).

S. aureus, infekte ettiği bölgede hızla kolonize olabilen bir bakteridir. *S. aureus*, yüksek virulansı, çevresel koşullara üstün adaptasyon yeteneği ve antibiyotiklere çok çabuk direnç geliştirebilmesi ile stafilokok türleri arasında özel bir yere sahiptir. Yeni geliştirilen antibiyotiklere bile oldukça hızlı ve etkin direnç mekanizmaları geliştirerek hastane enfeksiyonlarının başta gelen etkenlerinden olmaktadır (18).

Bu şartlar altında *S. aureus* benign cilt enfeksiyonlarından hayatı tehdit eden sistemik hastalıklara kadar çok çeşitli enfeksiyonlara neden olur (10).

***S. AUREUS* ENFEKSİYONLARI**

S. aureus vücutta herhangi bir organ veya dokuyu enfekte edebilir. Deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları en sık görülenleridir. Bu enfeksiyonlar lokalize bir enfeksiyondan selülit, impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül ve cerrahi yara enfeksiyonlarına kadar sıralanabilmektedir (47).

S. aureus'ların oluşturduğu hastalıklar toksikojenik (toksik şok sendromu, besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu, vb.) ve piyojenik (impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül, selülit, blefarit, mastit, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, priardit, osteomyelit, septik artrit, piyomyozit, sepsis, pnömoni, idrar yolu

enfeksiyonları, metastatik abseler, intraabdominal enfeksiyonlar, santral sinir sistemi enfeksiyonları, menenjit vb.) olmak üzere iki grupta incelenebilir (7, 10).

İnvaziv enfeksiyonlar mikroorganizmanın kolonizasyonu ile başlar. Cilt ve müköz membran gibi bariyer sistemlerinin bozulması, invazyona zemin hazırlar. Bakteriyemi gelişen bazı olgularda primer enfeksiyon kaynağı belirlenemeyebilir. Bazen de birden fazla metastatik abse odakları gelişebilir. Venlerdeki enfeksiyon odaklarından (septik tromboflebit gibi) akciğerlere yayılım ve metastatik abse oluşumu, *S. aureus* bakteriyemisinin önemli özelliklerinden birisidir. Vertebra osteomyeliti ve endokardit en sık görülen metastatik komplikasyondur (7, 10).

Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

İnsanlarda en sık görülen enfeksiyon tipidir. Kıl folikülü enfeksiyonunun (folikülit) deri altı dokuya yayılmasıyla fronkül ve karbonkül meydana gelir. Fronkül kabarcık şeklinde lokal bir lezyon görünümündedir. Enfeksiyon deri altı dokuya penetre olduktan birkaç saat sonra ödem, kızarıklık ve ağrı oluşur. Ödemli bölgenin üzerindeki deri parlak ve incidir. Kısa bir süre sonra drene olur. Bazen çevresinde kendiliğinden inokülasyon sonucu uydu nodüller oluşabilir. Genç yetişkinlerdeki fronküloz vakaları ile PVL üreten *S. aureus* suşları arasında ilişki bulunmuştur (33, 39). Böyle vakalar, hayatı tehdit eden nekrotizan pnömoni riski taşırlar. Karbonküle ise daha fazla odak ve fibroz dokunun derin tabakalarına yayılım vardır. Yüz, boyun ve sırt bölgesinde sıklıkla görülür. Püstüler ve impetigo şeklindeki lezyonlar yenidoğanlarda ve çocuklarda daha sık görülür. İmpetigo, derinin yüzeysel tabakalarında kabuklu püstüllerin oluşumu ile karakterizedir. Çok bulaşıcı olup kreş ve okullarda epidemik tarzda yayılır (10, 12).

Apokrin ter bezlerinin rekürren bir piyojenik enfeksiyonu olan hidradenitis süppurativa sıklıkla *S. aureus*'a bağlı gelişir. Aksiller, perineal ve genital alanlarda gelişen fronküllerdir. Lezyonlar genellikle sinus yolları ve hipertrofik skar oluşturarak kendiliğinden drene olur. *S. aureus* ile ilişkili bütün lokalize, primer cilt enfeksiyonları derin dokulara hızla yayılabilir ve sellülit, lenfanjit ve nekrotizan fasiit meydana getirebilir (9, 10, 46, 48).

S. aureus deride kolonize olabilen bir bakteridir, bu nedenle cerrahi sonrası oluşan yara enfeksiyonlarında özel bir öneme sahiptir. *S. aureus*'a bağlı olarak %15-

20 oranında görülmektedir. Cerrahi yara enfeksiyonları, ameliyattan iki gün veya daha uzun süre sonra insizyon bölgesinde ödem, eritem, ağrıyla birlikte konstitusyonel semptomlar ve ateşin de eşlik ettiği bir tablodur (9, 10, 46, 48).

Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Lober, interstisyel pnömoni ve lokal septik emboli yapabilir. Stafilokokal pnömonide, abse oluşumuna eğilim vardır. Akciğer parankim harabiyeti ile bronkopnömoni, fulminan hemorajik pnömoni tabloları gelişebilir. Hastalarda yüksek ateş, sarı- kanlı balgam çıkarma ve öksürük mevcuttur (12).

PVL'nin esas olarak deri ya da mukozayı içeren nekrotik lezyonlarla ve toplum kaynaklı pnömoniyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Toplum kaynaklı ağır nekrotizan pnömonili hasta izolatlarında yüksek oranda PVL geni saptanmıştır (12, 34, 38, 49).

Haşlanmış Deri Sendromu

Yüzeysel bir deri enfeksiyonudur. "Ritter'in hastalığı" olarakta anılmaktadır. Tipik olarak *S. aureus*'ta bulunan Eksolyatif toksin A veya B'den (ETA-ETB) biri ile meydana gelmektedir (50).

Toksik Şok Sendromu

Hastalığın toksijenik suşlar tarafından üretilen Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1) tarafından meydana geldiği gösterilmiştir. Menstural ve non-menstural Toksik Şok Sendromu olmak üzere iki klinik şekilde meydana gelmektedir (20).

Besin Zehirlenmesi

S. aureus, kusma ve ishal gibi gastrointestinal semptomlara neden olan SAg olarak adlandırılan 15'ten fazla egzotoksini içermektedir. Sindirimden 2-6 saat sonra halsizlik, mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve diare ile başlayan hastalıkta ateş yoktur (51, 52).

ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI

Stafilokokların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıkları zamanla değişmekte ve farklı direnç oranları saptanabilmektedir. *S. aureus* 1940'lı yıllarda penisilin ile tedavi edilebilirken 1950'lerde eritromisin ve tetrasiklin direnci gözlenmiş, 1961'de metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tanımlanmıştır. MRSA suşlarının çoklu ilaç direnci göstermesi ve tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı sonucu betalaktam dışındaki antibiyotikler önem kazanmıştır. Bu antibiyotiklerin etkinlikleri ise antibiyotik duyarlılık testleri ile gösterilmiştir (12, 53).

MRSA suşlarının çoğu başta beta-laktam antibiyotikler olmak üzere (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler gibi) aminoglikozitlere ve tetrasikline de dirençlidir (12). TMP-SMX, TK-MRSA kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonunda ilk seçenek ilaç olarak önerilmektedir (54). *S. aureus* suşlarında florokinolon grubu ilaçlara karşı yaygın direnç vardır ve tedavi sırasında çok kısa zamanda direnç oluşabilmektedir. Rifampine karşıda çok kısa bir sürede direnç gelişebildiği için bu ilaç da tek başına kullanılmamalıdır (55, 56).

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları başta metisilin olmak üzere, tüm beta laktamlara dirençli kabul edildiğinden MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptit antibiyotiklerin tek başına kullanılması önerilmektedir. Hastanede yatan hastalarda ciddi MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin primer ajandır (7).

İlk kez 1997 yılında Japonya ve ardından Amerika Birleşik Devletleri'nde vankomisine duyarlılığı azalmış *S. aureus* (VISA) suşları bildirilmiştir. Özellikle PBP2 ve PBP2a'nın aşırı üretiminin vankomisin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılında enterokoklardan aktarılan vanA genine bağlı olarak vankomisine dirençli 2 *S. aureus* izolatu rapor edilmiştir (7, 57, 58). Türkiye'de yapılmış çalışmalarda vankomisin direnci saptanmamıştır (54, 59-61).

METİSİLİN DİRENCİ ve STAFİLOKOKAL KASET KROMOZOM

Penisilin Direnci

Penisilin ilk defa 1940 yılında stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve böylece stafilokok enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde belirgin bir azalma görülmüştür. İlk kez İngiltere’de 1944 yılında penisiline dirençli stafilokok suşları rapor edilmiştir (61, 62).

Bir penisilin türevi olan metisilin, β -laktamaz enzimine dirençlidir. β -laktamaz enzimine dirençli antibiyotikler (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) içerisinde 1959 yılında ilk üretilen ve klinikte ilk kullanılan antibiyotik olmasına rağmen ciddi interstisyel nefrit yapma yan etkisinden dolayı klinikte kullanımından vazgeçilmiştir. Sadece laboratuvarlarda deneysel amaçlı kullanılmaktadır (63, 64).

MRSA ilk kez, 1960’larda Amerika’da Boston hastanesinden rapor edilen bir salgında tanımlanmıştır (65). Bu dirençli suşlar birçok Avrupa hastanesinden de bildirilmiştir. 1975’te özellikle yanık üniteleri ve eğitim hastanelerinden düzenli olarak MRSA salgınları bildirilmiştir (66). Amerika Birleşik Devletleri’nde hastanelerde MRSA görülme sıklığı sürekli artış göstermiştir. Kurumsal ve coğrafik değişimler olmakla beraber, hastaneler ve diğer sağlık kuruluşlarında (huzurevleri v.b.) bu suşların görülme sıklığı belirgin olarak artmaktadır (2).

Günümüzde stafilokok suşlarında penisilin direnci %80-90’lara ulaşmıştır. Penisilinazlar, penisilin ile beraber bazı beta-laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için beta-laktamaz olarak adlandırılırlar. Taşınabilir bir gen olan beta-laktamaz geni; genelde diğer antibiyotik direnç genleri ile birlikte plazmid üzerinde bulunur (16).

İnvitro olarak metisiline dirençli bulunan stafilokok suşları, diğer β -laktam antibiyotiklere de dirençli kabul edilmiştir (63, 64).

Stafilokoklarda tanımlanan beta-laktamaz; blaZ geni tarafından kodlanır. Bu gen bölgesinin ekspresyonu blaR1, blaR2 (regulator) ve blaI (inhibitor) gibi düzenleyici genler tarafından kontrol edilir. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi stafilokoklarda da betalaktamaz üretiminin indüklenebilirlik özelliği vardır. İnhibisyondan sorumlu blaI geni ortamda beta laktam antibiyotik yokluğunda blaZ ve blaR gen bölgelerinin çalışmasını baskı altında tutarak düşük seviyede beta-

laktamaz üretimine sebep olur. Ortamda betalaktam antibiyotik varlığında ise blaZ geni blaR1 tarafından uyarılarak yüksek seviyede beta-laktamaz üretilir (16, 67).

Stafilokoklardaki metisilin direnci üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (20);

- 1) Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci.
- 2) Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması.
- 3) PBP'lerdeki yapısal değişiklikler.

1) *Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci*

Yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) sentezi nedeniyle oluşan ve en sık karşılaşılan dirençtir. MRSA suşlarında MSSA suşlarından farklı bir PBP vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu gen indüklenebilir ve dirençli suşlardan duyarlı suşlara transdüksiyon ile aktarılabilir. *mecA* geni regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör geni ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber stafilokokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınır (20, 68).

Kromozomal metisilin direnci fenotipik olarak üç şekilde ortaya çıkmaktadır (69);

- a) Homojen direnç; bakterilerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar. Hepsinde de *mecA* geni vardır ve PBP2a sentezlenmektedir.
- b) Heterojen direnç;. kolonide bulunan tüm bakteriler *mecA* genini taşımalarına rağmen sadece belirli bir kısım bakteride metisilin direnci görülür. Klinikte daha sık görülmektedir. Heterojen direnç gösteren MRSA topluluğunda, bakterilerin çoğunluğu düşük metisilin konsantrasyonlarına (1-5 $\mu\text{g/ml}$) duyarlı iken, bakterilerin bir kısmı yüksek metisilin konsantrasyonlarına ($\geq 50\mu\text{g/ml}$) direnç göstermektedir. Bu direnç indüklenebilir ve buna *fem* “factors essential for the expression of methicillin resistance” sisteminin neden olduğu düşünülmektedir.
- c) Eagle-tip direnç ise yeni tanımlanan metisilin direnç fenotipidir. Bu tip direncin, homojenden heterojen metisilin direncine dönüşümüne neden olan chr mutasyonuna

bağlı olduğu ve yüksek metisilin konsantrasyonlarında sağlam *mecA* regülatör genlerinin PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir. (69).

MecA genini taşıyan plazmid ve transpozonlar, β -laktam antibiyotiklerden başka, kinolonlar, makrolidler, kloramfenikol, klindamisin tetrasiklinler, aminoglikozidler, sülfametoksazol/trimetoprim ve rifampin direncinden sorumlu genleri de taşımaktadır. MRSA suşlarının 1970'li yıllardan beri gittikçe artan antibiyotik direnci ile önemli patojenler haline gelmesinde direnç genlerinin, transpozonlar ve plazmidler aracılığı ile kolay ve etkin bir şekilde aktarılmasının yanında SCC*mec* gibi iyi organize olmuş yapıların önemi de büyüktür. Bu sebeple ciddi MRSA enfeksiyonları ve hastane salgınları da sıkça rapor edilir olmuştur (5, 64).

2) Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması

Sınırdaki (borderline) metisilin direncine neden olmaktadır. Metisilin β -laktamaz enzimine dayanıklıdır. Ancak, McDougal ve arkadaşları (70), metisiline direnç gelişmesine aşırı miktarda β -laktamaz üretiminin de neden olabileceğini göstermişlerdir. Bu suşlar Borderline resistant *S. aureus* (BORSA) olarak adlandırılırlar (70). Bu tür direnç, beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesi ile yenilebilir (67).

3) PBP'lerdeki yapısal değişiklikler

Mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşan dirençtir. Son yıllarda *mecA* geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Nadir görülen bu suşlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca *mecA* negatif olmasına rağmen oksasilin MİK değerleri 8-16 mg/L civarında olan suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın aşırı üretiminden (BORSA), bir kısmı da var olan PBP'lerdeki özellikle PBP2 ve PBP4'de nokta mutasyonlarından [Moderately resistant *S. aureus* (MODSA)] veya düşük molekül ağırlıklı PBP olan PBP4'ün aşırı yapımından kaynaklanabilir (16, 67, 20).

Stafilokokal Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*)

MecA geni; 2.1 kb uzunluğunda olup Stafilokok Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*) olarak adlandırılan 21-67 kb büyüklüğündeki mobil genetik eleman üzerinde yer alır (7). SCC, stafilokok türleri arasında genetik değişimi sağlayan genomik adalardır. SCC*mec*, SCC'lerin metisilin direnci taşıyan özel bir tipidir (71). 2001 yılında, Ito ve arkadaşları, *mecA* geninin yerleştiği genom bölgesini araştırmışlar, *mecA* geninin mobil bir genetik adacık üzerinde yerleştiğini göstermişler ve bu yapıya SCC*mec* adını vermişlerdir (72). SCC*mec* bakteriyofajlar, transpozonlar, konjugatif transpozonlar veya integre olabilen plazmidler gibi bilinen diğer mobil genetik elemanlardan farklıdır. Genomik bir ada gibi görülse de *S. aureus*'un virulansı ile ilişkili hiçbir gen içermediği için patojenite adalarından farklıdır (73).

KNS türlerinde ve Metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında da SCC bulunmaktadır fakat SCC*mec* içermemektedirler. *mecA* içermeyen SCC'ler daha çok mikroorganizmanın stres durumlarında hayatta kalmasına yardımcı olan genleri taşımaktadır (5, 74) MRSA suşlarının en belirleyici özelliği SCC*mec*'e sahip olmalarıdır. Bu mobil genetik element *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu beta laktam direnci için önemli bir belirleyicidir. MSSA suşlarının kromozomlarının SCC*mec* elemanlarını kazanmasıyla metisilin dirençli stafilokok suşları ortaya çıkmaktadır (75).

SCC*mec* kasetinin kökeni henüz bilinmemektedir. Günümüze kadar SCC*mec* elemanlarının farklı yapısal organizasyonu ve genetik içeriği ile sekiz farklı SCC*mec* tipi ve alt tipleri tanımlanmıştır. İlk olarak SCC*mec* Tip I, II ve III (72, 76), sonra SCC*mec* Tip IV, V, VI, VII, VIII tanımlanmıştır (77, 78).

SCC*mec* Tip I, II ve III asıl olarak hastanede kazanılmış metisilin dirençli stafilokok (HK MRSA) suşlarında bulunur. Bunlar plazmid veya transpozonlar gibi genetik elemanlar üzerinde taşınır. SCC*mec* tip II ve III beta laktam dışı çoklu antibiyotik direncine sebep olur. Bunun sebebi, tip II ve III elemanların kaset içine entegre olmuş plazmidler (pUB110, pI258 ve pT181) ve bir transpozon (Tn 554) aracılığıyla ek direnç genleri taşımalarıdır. Plazmid pUB110, kanamisin ve tobramisin direncinden sorumlu *ant*(4') genini; pI258 penisilin ve ağır metal

direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşıırken, Tn 554 ise indüklenebilir MLSb tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır (79).

SCC*mec* Tip IV ve V tipik olarak TK-MRSA suşlarında bulunur (79). Bu gen kasetlerinin diğer gen kasetlerine kıyasla çok daha küçük olması diğer suşlara yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca bu gen kasetlerinde beta laktam dışı antibiyotiklere direnç geni bulunmaz. TK-MRSA'da metisilin direnç kazanım mekanizması SCC*mec* gen kaseti aracılığıylaadır. Bu gen kasetinin boyutunun küçük olması ve hareketliliğini sağlayan genlere sahip olması nedeniyle, gelecekte ciddi sağlık problemlerine neden olması ve diğer gram pozitif bakterilerde de görülmeye başlamasının kaçınılmaz olacağı belirtilmiştir (80).

Koagülaz negatif stafilokoklar da MRSA gibi SCC*mec* taşıyabilir. 1970'li yıllarda izole edilmiş olan metisiline dirençli *S. epidermidis* izolatlarının SCC*mec* Tip I-IV taşıdığı gösterilmiştir (81).

SCC*mec*; replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır (73, 82, 83).

SCC*mec*, *mecA* ve regüle edici genler (*mec* gen kompleksi) ve rekombinaz geni (*ccr*) kompleksinden oluşmuştur. (73, 82, 83). SCC*mec* elemanları, *ccr* geni kompleks allotiplerine ve *mec* gen sınıfının farklı kombinasyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (68, 73).

SCC*mec* kasetinde ikinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi kasetin bakteriyel genomu integrasyonu ve eksizyonundan sorumludur. Bunlar invertaz/ rezolvaz ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan genlerdir. SCC*mec*'in mobilitesinden sorumludurlar. *ccrA* invertaz varlığında, SCC*mec* kromozomun doğru bölgesine girer ve *ccrB* rezolvaz ile kromozomdan eksiksiz olarak ayrılır (74, 83).

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

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

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

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

Tip V SCC*mec*, sınıf C *mec* ve *ccrC*;

Tip VI SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi tip IV *ccr* gen kompleksi;

Tip VII *SCCmec*, sınıf C *mec* kompleksi ve *ccrC*;

Tip VIII *SCCmec*, sınıf A *mec* kompleksi ve tip 4 *ccr* gen kompleksi içermektedir (75, 78).

SCCmec tiplerine ilaveten birçok varyant tanımlanmıştır. Örneğin, I A, II (A-G), III (A ve B), IV (a, b, c, d, E, A, g). Bu varyantlar J bölgelerindeki farklılıklara göre ortaya çıkmıştır. *SCCmec* tiplendirmesi ile HK-MRSA ile TK-MRSA'ların farklı oldukları gösterilmiştir. Tüm dünyada, *SCCmec* tiplerinden Tip I, II, III ve VIII hastane kökenli, Tip IV, V, VI ve VII toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunduğu bildirilmiştir (75, 88).

SCCmec Tip II ve *SCCmec* Tip IV taşıyan izolatların üretildikleri klinik örnekler arasında önemli derecede farklılık vardır. Genellikle *SCCmec* Tip II izolatları sıklıkla çocuk ve yetişkinlerin solunum yolu örneklerinden izole edilirken *SCCmec* Tip IV izolatları deri, yumuşak doku, apseler ve ameliyat sonrası yaralardan izole edilmektedir (84).

GEREÇ VE YÖNTEM

SUŞLARIN İZOLASYONU VE SAKLANMASI

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Aralık 2010–Nisan 2012 tarihleri arasında, ayaktan ve yatan hastalardan gönderilen yara ve yara dışı örneklerden izole edilen toplam 200 adet *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edildi. Bu suşların 65'i MRSA, 135'i MSSA olarak tanımlandı. Aynı hastaya ait birden çok defa gönderilmiş örneklerden sadece tek bir örneği çalışmaya alındı.

Suşlar standart yöntemlerle tanımlandı (7). Çalışmaya alınan *S. aureus* suşları; çalışma anına kadar uygun koşullarda saklandı. Çalışma sırasında suşlar, %5 koyun kanlı besiyerine ekilerek bir gece 37°C'de inkübe edildi. Taze kültürlerden elde edilen koloniler çalışmada kullanıldı. Üreyen koloniler beta hemoliz oluşturma, koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz ve koagülaz enzimi üretimi ile tür düzeyinde tekrar tanımlanıp doğrulandı.

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞININ SAPTANMASI

Antibiyotik duyarlılıkları CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Vankomisin, penisilin, gentamisin, siprofloksasin, azitromisin, meropenem, sefotaksim, amoksisilin-kavulonat, kloramfenikol, trimetoprim-sulfometoksazol, teikoplanin, rifampisin, tetrasiklin, klindamisin, eritromisin (Bioanalyse-Türkiye) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklar test edildi. Sonuçlar CLSI standartlarına göre yorumlandı (85).

METİSİLİN DİRENCİNİN SAPTANMASI

Metisilin direnci, CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ve oksasilin tuz agar tarama testi ile yapıldı (85).

Disk Difüzyon Yöntemi

Çalışmaya alınan suşların 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonları, Müller-Hinton Agar besiyerine ekildi ve 1µg oksasilin (Oxoid-

İngiltere), 30µg sefoksitin diski (Oxoid- İngiltere) konuldu. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra, oksasilin için 10 mm ve daha küçük, sefoksitin için ise 21mm ve daha küçük zon çapları olan izolatlar metisiline dirençli kabul edildi (85).

Oksasilin Tuz Agar Tarama Testi

Oksasilin tuz agar tarama testi CLSI standartlarına göre yapıldı. %4 NaCl içeren Müller-Hinton Agara oksasilin toz 6 µg/ml eklendi. Hazırlanan besiyeri petrilere döküldü. Test tüplerinde 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonları, besiyerine ekildi. Besiyerleri 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreme olması durumunda oksasiline dirençli kabul edildi (85).

BAKTERİYEL DNA'NIN EKSTRAKSİYONU

Bakteri DNA ekstraksiyonunda hazır ticari kit kullanıldı (PeqGold Bacterial DNA Kit- peQlab- Almanya). DNA ekstraksiyonu kit önerileri doğrultusunda aşağıda tanımlandığı şekilde yapıldı.

S. aureus'ların %5'lik koyun kanlı agarda bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen saf tek kolonilerinden 1-2 koloni alınıp Brain Heart Infusion Broth (BHIB) içinde homojen süspansiyon haline getirildi. Bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra elde edilen bakteri süspansiyonu 4000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üzerinde kalan sıvı kısım atıldı. Tüpün içine 100 µl TE buffer ve 100 µl lizozim (10mg/ml) eklendi. Tüpler 30°C'de çalkalamalı su banyosunda 10 dakika inkübasyonu takiben oda ısısında 4000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üzerine 200µl DNA lizis Buffer T eklendi. DNA lizis buffer T içindeki hücrelere 20 µl Proteinaz K solüsyonu ve 15µl RNA'az A (20 mg/ml) eklendi. On saniye vortekslenen tüpler tam etkili bir lizis için 70°C'de çalkalamalı su banyosunda 30 dakika süre ile inkübe edildi.

Homojenize edilerek lizise uğratılan bakteri süspansiyonunun üzerine 200 µl DNA-binding buffer eklendi ve pipetlenerek tamamen karıştırıldı. Perfect DNA kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve elde edilmiş lizat tamamen kolonun içine aktarıldı. 10000g'de 1 dakika santrifüj ile DNA bağlanması sağlandı. Toplama tüpü santrifüjden çıkarıldı ve kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.

Yeni toplama tüpüne yerleştirilmiş kolon üzerine 650µl etanolde dilüe edilmiş DNA wash buffer eklenerek yıkandı. 10000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü santrifüjden çıkarıldı ve kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Yıkama basamağı 650µl DNA wash buffer ile birkez daha tekrarlandı.

Elde edilen kolon yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. 10000g'de 2 dakika santrifüj ile kolon yüzeyi kurutuldu.

Kolon, steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Elution buffer'dan 100µl eklendikten sonra 3 dakika oda ısısında bekletildi. Kolondan ayrılan DNA 6000g'de 1 dakika santrifüjlendi. Böylece DNA ekstraksiyonu yapılmış oldu. Kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki son ürün toplama tüplerine alındı. Elde edilen son ürün PCR çalışmalarında bakteriyel DNA olarak kullanıldı.

***Mec A* GENİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Mec A genin saptanması için aşağıdaki primerler kullanıldı (86-89).

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

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

PCR protokolü için amplifikasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (90):

| | |
|-----------------------------|------------|
| Distile su | 29.75µl |
| PCR tampon (10 x) | 5µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5µl |
| dNTP mix (2 mM) | 4µl |
| <i>mecA1</i> (100 pmol/µl) | 0.5µl |
| <i>mecA2</i> (100 pmol/µl) | 0.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U) | 0.25µl |
| <u>Total DNA</u> | <u>5µl</u> |
| Toplam | 50µl |

Hazırlanan tüpler Thermal Cycler'a (BIO-RAD-ABD) yerleştirildi ve amplifikasyon programı aşağıdaki gibi düzenlendi.

| | <u>SICAKLIK</u> | <u>SÜRE</u> |
|--------------------|-----------------|-------------|
| Ön denatürasyon | 94°C | 4 dk |
| Denatürasyon | 94°C | 30 sn. |
| Primer bağlanması | 55°C | 30 sn. |
| Primer uzaması | 72°C | 2 dk. |
| Son uzama basamağı | 72°C | 5 dk. |

Elde edilen amplifikasyon ürünleri 100V'da 1 saat boyunca etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonrasında jel UV ışığında CCD kamera ile (Gel Logic 2200 Kodak ve DNR Bio-imaging systems, İsrail) ile görüntülenerek fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, 0.1-10kb (Biolab-İngiltere) DNA moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak belirlendi. 1800 bç büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (86, 91, 92). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

PVL GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

PVL genlerinin araştırılmasında iki farklı primer seti ile iki ayrı protokol uygulandı.

Her iki protokol; daha önceki araştırmalarda primer bağlanma ısı değerinin PVL saptanmasını etkilediğinin bildirilmiş olması nedeniyle (93) iki farklı bağlanma ısı değerinde de çalışıldı.

Birinci protokolda *lukPVI* ve *lukPV2* olmak üzere iki adet primer kullanıldı (30, 93).

Primerlerin dizilimleri:

lukPVI: 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'

PCR protokolü için amplifikasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (90):

| | |
|-----------------------------|------------|
| Distile su | 29.75µl |
| PCR tampon (10 x) | 5µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5µl |
| dNTP mix (2 mM) | 4µl |
| <i>lukPVI</i> (100 pmol/µl) | 0.5µl |
| <i>lukPV2</i> (100 pmol/µl) | 0.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U) | 0.25µl |
| <u>Total DNA</u> | <u>5µl</u> |
| Toplam | 50µl |

Hazırlanan tüpler Thermal Cycler'a (BIO-RAD-ABD) yerleştirildi ve amplifikasyon programı aşağıdaki gibi düzenlendi.

| | <u>SICAKLIK</u> | <u>SÜRE</u> |
|--------------------|-----------------|-------------|
| Ön denatürasyon | 94°C | 4 dk |
| Denatürasyon | 94°C | 30 sn. |
| Primer bağlanması | 58°C | 30 sn. |
| Primer uzaması | 72°C | 1 dk. |
| Son uzama basamağı | 72°C | 4 dk. |

} 30 döngü

Elde edilen amplifikasyon ürünleri 100 V'da 1 saat boyunca etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonrasında jel UV ışığında CCD kamera ile (Gel Logic 2200 Kodak ve DNR Bio-imaging systems, İsrail) ile görüntülenerek fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, Ø174 DNA (Biolab-İngiltere) ve 100bç DNA marker (Bioron-Almanya) ile karşılaştırılarak belirlendi. 433 bç büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi (30, 93). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 (37, 94) ve daha önceden PVL pozitif tanımlanmış *S. aureus* suşu kullanıldı (Bu suş, Dr. Bülent Bozdoğan'dan sağlanmıştır). Bu protokol ayrıca primer bağlama ısısı 55°C olacak şekilde çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı (30, 93).

İkinci protokolde PVL genleri için *PVLup* ve *PVLdn* olmak üzere iki adet primer kullanıldı (40, 93).

Primerlerin dizilimleri:

PVLup (5' AAG ACT ATT AGC TGC AAC ATT GTC3')

PVLdn (5' AAT CTA TCT GTT TAG CTC ATA GGA3')

PCR protokolü için amplifikasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı:

| | |
|---------------------------|------------|
| Distile su | 29.75µl |
| PCR tampon (10 x) | 5µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5µl |
| dNTP mix (2 mM) | 4µl |
| <i>PVLup</i> (25 pmol/µl) | 0.5µl |
| <i>PVLdn</i> (25 pmol/µl) | 0.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U) | 0.25µl |
| <u>Total DNA</u> | <u>5µl</u> |
| Toplam | 50µl |

Hazırlanan tüpler Thermal Cycler'a (BIO-RAD-ABD) yerleştirildi ve amplifikasyon programı aşağıdaki gibi düzenlendi.

| | <u>SICAKLIK</u> | <u>SÜRE</u> |
|---------------------------|-----------------|-------------|
| Lizis ve ön- denatürasyon | 94°C | 4 dk |
| Denatürasyon | 94°C | 30 sn. |
| Primer bağlanması | 48°C | 1 dk. |
| Primer uzaması | 72°C | 2 dk. |
| Son uzama basamağı | 72 °C | 4 dk. |

Elde edilen amplifikasyon ürünleri 100 V'da 1 saat boyunca etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonrasında jel UV ışığında CCD kamera ile (Gel Logic 2200 Kodak ve DNR Bio-imaging systems, İsrail) ile görüntülenerek fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, 0.1-10kb (Biolab-İngiltere) DNA marker ile karşılaştırılarak belirlendi. 1918bç büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *S.*

aureus ATCC 25923 (37, 94) ve daha önceden PVL pozitif tanımlanmış *S. aureus* suşu kullanıldı (Bu suş Dr. Bülent Bozdoğan'dan sağlanmıştır). Bu protokol ayrıca primer bağlanma ısı 50°C olacak şekilde tekrar çalışılarak sonuçlar karşılaştırıldı (40, 93).

SCCMec GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

SCC*mec* geninin varlığı multipleks PCR ile çalışıldı. Multipleks PCR yönteminde aşağıdaki primer dizilimleri kullanıldı (3).

| | | |
|---|---|---------|
| CIF2 F2: 5' TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G 3' | } | Lokus A |
| CIF2R2: 5' ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C 3' | | |
| KDP F1: 5' AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C 3' | } | Lokus B |
| KDP R1: 5' CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G3' | | |
| MEC1P2: 5' ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC 3' | } | Lokus C |
| MEC1P3: 5' GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC 3' | | |
| DCS F2: 5' CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC 3' | } | Lokus D |
| DCS R1: 5' CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG 3' | | |
| RIF4 F3: 5' GTG ATT GTT CGA GAT ATG TGG 3' | } | Lokus E |
| RIF4 R9: 5' CGC TTT ATC TGT ATC TAT CGC 3' | | |
| RIF5 F10: 5' TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G 3' | } | Lokus F |
| RIF5R13: 5' GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C 3' | | |
| pUB110 R1: 5' GAG CCA TAA ACA CCA ATA GCC 3' | } | Lokus G |
| IS431 P4: 5' CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG 3' | | |
| IS431 P4: 5' CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG 3' | } | Lokus H |
| pT181 R1 : 5' GAA GAA TGG GGA AAG CTT CAC 3' | | |
| <i>mecA</i> P4: 5' TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G 3' | } | Mec A |
| <i>mecA</i> P7: 5' CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG 3' | | |

PCR protokolü için amplifikasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı (90):

| | |
|-------------------------------|------------|
| Distile su | 22.5µl |
| PCR tampon (10 x) | 5µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5µl |
| dNTP mix (2 mM) | 4µl |
| Herbir primerden(100 pmol/µl) | 0.5µl |
| Taq DNA polimeraz (5U) | 0.25µl |
| <u>Total DNA</u> | <u>5µl</u> |
| Toplam | 50µl |

Hazırlanan tüpler Thermal Cycler'a (BIO-RAD-ABD) yerleştirildi ve amplifikasyon programı aşağıdaki gibi düzenlendi (3).

| | <u>SICAKLIK</u> | <u>SÜRE</u> |
|--------------------|-----------------|-------------|
| Ön denatürasyon | 94°C | 4 dk |
| Denatürasyon | 94°C | 30 sn. |
| Primer bağlanması | 53°C | 30 sn. |
| Primer uzaması | 72°C | 1 dk. |
| Son uzama basamağı | 72 °C | 4 dk. |

Elde edilen amplifikasyon ürünleri 100 V'da 1 saat boyunca etidyum bromür ile boyanmış %1.5'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonrasında jel UV ışığında CCD kamera (Gel Logic 2200 Kodak ve DNR Bio-imaging systems, İsrail) ile görüntülenerek fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, Ø174 (Biolab-İngiltere) ve 100bç DNA marker (Bioron-Almanya) ile karşılaştırılarak aşağıdaki belirtilmiş olan Tablo-1'den yararlanılarak değerlendirildi (3, 90). Değerlendirilmede dizi analizi yapılmamış olması ve mevcut multipleks PCR yöntemi ile bazı ara tiplerin tam olarak tanımlanamıyor olması nedeniyle bazı tiplerin tanımlanmasında "benzeri" ifadesi kullanıldı (95). Kontrol suşlar olarak; Tip III, IV için daha önce SCC_{mec} tiplendirilmesi yapılmış *S. aureus* suşları ve Tip II için ATCC 43300 kullanıldı. (Tip III ve Tip IV kontrol suşları Dr. Bülent Bozdoğan'dan sağlanmıştır).

Tablo 1: SCC_{mec} tiplendirmesi için multipleks PCR gen bölgeleri

| SCC <i>mecI</i> | SCC <i>mecIA</i> | SCC <i>mecII</i> | SCC <i>mecIII</i> | SCC <i>mecIIIA</i> | SCC <i>mecIIIB</i> | SCC <i>mecIV</i> | SCC <i>mecIVA</i> |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 | 162 |
| 342 | 342 | 209 | 209 | 209 | 209 | 342 | 342 |
| 495 | 381 | 284 | 243 | 243 | | | 381 |
| | 495 | 342 | 303 | 414 | | | |
| | | 381 | 414 | | | | |

İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (Statistical Packet for The Social Sciences) 18 paket programı kullanılarak analiz edildi. Çalışmada kategorik veriler için frekanslar ve oranları verildi. Verilerin analizinde ki-kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 200 *S. aureus* suşu 65 (%32.5) MRSA ve 135 (%67.5) MSSA olarak tanımlandı. MRSA suşları, en fazla Anestezi ve Yoğun Bakım (%35.4) ile Kardiyovasküler Cerrahi (%15.4), MSSA suşları ise en fazla Dermatoloji (%31.9) kliniğinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. MRSA ve MSSA suşlarının gönderildikleri bölümlere göre dağılımı Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: MRSA ve MSSA suşlarının gönderildiği bölümlere göre dağılımı.

| BÖLÜM | MRSA (N:65) n (%) | MSSA (N:135) n(%) |
|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Kalp-Damar Cerrahisi | 10 (15.4) | 8 (5.9) |
| Anestezi ve Yoğun Bakım | 23 (35.4) | 4 (3.0) |
| Plastik Cerrahi | 3 (4.6) | 3 (2.2) |
| Göğüs Hastalıkları | 2 (3.1) | 13 (9.6) |
| Dahiliye | 3 (4.6) | 17 (12.6) |
| Ortopedi | 4 (6.2) | 9 (6.7) |
| Göğüs Cerrahisi | 1 (1.5) | 1 (0.7) |
| Çocuk Hastalıkları | 2 (3.1) | 19 (14.1) |
| Beyin Cerrahi | 4 (6.2) | 7 (5.2) |
| Üroloji | 5 (7.7) | 4 (3.0) |
| Dermatoloji | 2 (3.1) | 43 (31.9) |
| Fizik Tedavi | 2 (3.1) | 1 (0.7) |
| Genel Cerrahi | 2 (3.1) | – |
| Enfeksiyon Hastalıkları | 1 (1.5) | 3 (2.2) |
| Nöroloji | 1 (1.5) | – |
| Kardiyoloji | – | 1 (0.7) |
| Göz | – | 1 (0.7) |
| Acil Servis | – | 1 (0.7) |

İncelenen 200 *S. aureus* suşununun 100’ü yara, diğer 100’ü ise yara-dışı örneklerden izole edilmiştir. MRSA suşlarının 21 (%32.3)’i yara örneklerinden, 44 (%67.7)’ü yara-dışı örneklerden izole edilirken, MSSA suşlarının 79 (%58.5)’u yara örneklerinden 56 (%41.5)’sı yara dışı örneklerden izole edilmiştir. MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri yara ve yara-dışı örneklere göre dağılımı Tablo 3’de gösterilmiştir.

MSSA suşları; yara örneklerinde yara-dışı örneklere göre daha fazla izole edilirken, MRSA yara-dışı örneklerde yara örneklerine göre daha fazla izole edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$).

Tablo 3: MRSA ve MSSA suşlarının izole edildikleri yara ve yara-dışı örneklere göre dağılımı.

| ÖRNEK TÜRÜ | Yara n (%) | Yara-dışı n (%) | <i>p</i> |
|---------------------|------------|-----------------|----------|
| MRSA (N:65) | 21 (32.3) | 44 (67.7) | 0.0001 |
| MSSA (N:135) | 79 (58.5) | 56 (41.5) | |

MRSA suşlarının 57 (%87.7)'si yatan hastalardan, 8 (%12.3) 'i ayakta izlenen hastalardan, MSSA suşlarının ise 66 (%48.9)'sı yatan hastalardan, 69 (%51.1)'u ayakta izlenen hastalardan izole edilmiştir. MSSA suşlarının izolasyon oranı yatan ve ayakta izlenen hasta örneklerinde benzer bulunurken; MRSA suşları yatan hasta örneklerinde ayakta izlenen hasta örneklerine göre daha fazla izole edilmiştir ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$) (Tablo 4).

Tablo 4: MRSA ve MSSA suşlarının yatan ve ayakta izlenen hastalardaki dağılımı.

| | Yatan hasta örnekleri (N:123) | Ayaktan hasta örnekleri (N:77) | <i>p</i> |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------|
| MRSA n (%) | 57 (87.7) | 8 (12.3) | 0.0001 |
| MSSA n (%) | 66 (48.9) | 69 (51.1) | |

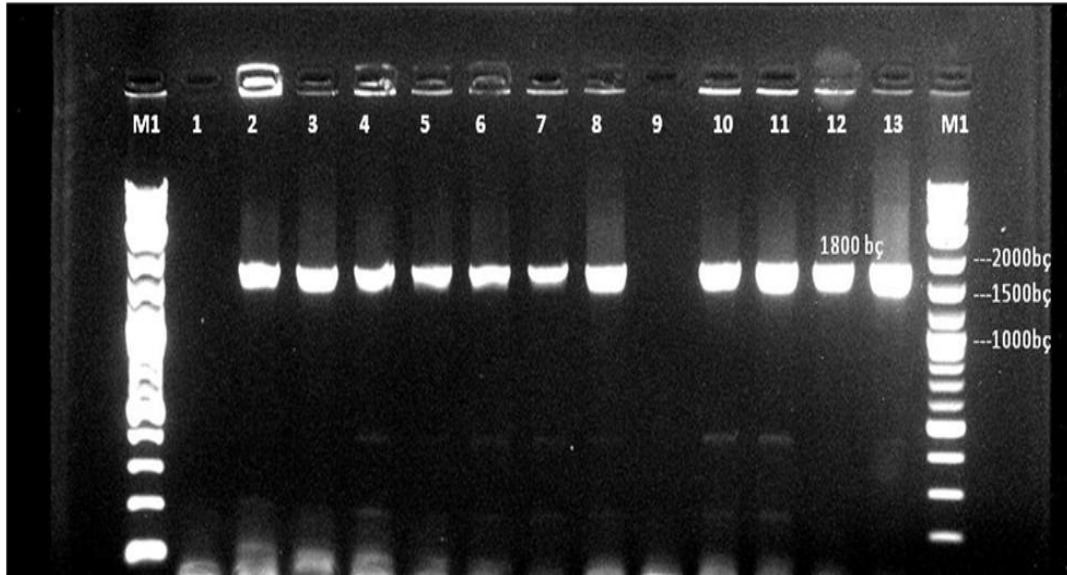
Çalışmaya alınan 200 suşun antibiyotik duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Yatan hastalardan izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik direnç dağılımlarına bakıldığında; 57 suşun 57'sinde de penisilin direnci bulunurken, 56 (%98.2)'sında rifampin ve sefotaksime, 54 (%94.7)'ünde tetrasiklin, amoksisilin- klavulonat ve meropenem, 51 (%89.5)'inde siprofloksasine, 50 (%87.7)'sinde gentamisine, 33 (%57.9)'ünde azitromisine ve 5 (%8.8)'inde trimetoprim/sulfametoksazole, 4 (%7.0)'ünde kloramfenikole direnç bulunmuştur. Ayaktan izlenen hastalardan izole edilen MRSA suşlarında ise, en

yüksek direnç oranı 8 suşun 8 (%100)'ünde penisiline karşı bulunurken, 7 (%87.5)'sinde tetrasikline, 6 (%75)'sında amoksisilin-klavulonat ve siprofloksasine, 5 (% 62.5)'inde azitromisin, gentamisin, rifampin ve sefotaksime, 4 (%50)'ünde meropeneme, 1 (%12.5)'inde sulfametoksazol ve kloramfenikole direnç bulunmuştur. Yatan hastalardan izole edilen MSSA suşlarında ise penisiline 36 suшта (%54.5), azitromisine 6 suшта (%9.1), siprofloksasine 4 suшта (% 6.1), rifampine 3 suшта (% 4.5), tetrasikline ve gentamisine 2 suшта (%3.0), kloramfenikole karşı 1 suшта (%1.5) direnç bulunurken sefotaksim, amoksisilin-klavulonat ve meropeneme karşı direnç bulunmamıştır. Ayaktan izlenen hastalardan izole edilen MSSA suşlarınının 36 (%52.2)'sında penisilin direnci, 7 (%10.1)'inde azitromisine, 5 (%7.2)'inde, 1'er suшта rifampine ve siprofloksasine karşı direnç bulunmuştur. Ayaktan ve yatan hastalardan izole edilen tüm MRSA ve MSSA suşlarında vankomisin ve teikoplanine karşı direnç görülmemiştir (Tablo 5).

Tablo 5: Yatan ve ayaktan izlenen hastalardan izole edilen MRSA ve MSSA suşlarınının antibiyotik direnç dağılım tablosu.

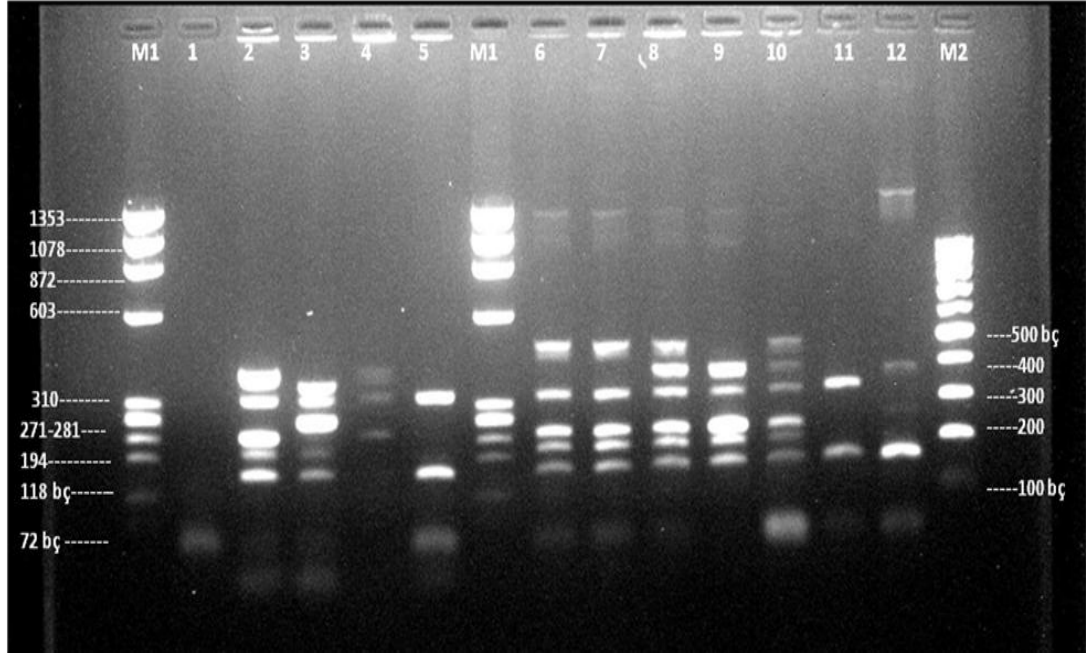
| ANTİBİYOTİK | MRSA | | MSSA | |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Yatan hasta n (%) | Ayaktan hasta n (%) | Yatan hasta n (%) | Ayaktan hasta n (%) |
| Penisilin | 57 (100) | 8 (100) | 36 (54.5) | 36 (52.2) |
| Sefotaksim | 56 (98.2) | 5 (62.5) | – | – |
| Amoksisilin- klavulonat | 54 (94.7) | 6 (75.0) | – | – |
| Meropenem | 54 (94.7) | 4 (50.0) | – | – |
| Siprofloksasin | 51 (89.5) | 6 (75.0) | 4 (6.1) | 1 (1.4) |
| Gentamisin | 50 (87.7) | 5 (62.5) | 2 (3.0) | – |
| Azitromisin | 33 (57.9) | 5 (62.5) | 6 (9.1) | 7 (10.1) |
| Trimetoprim/sulfametoksazol | 5 (8.8) | 1 (12.5) | – | – |
| Kloramfenikol | 4 (7.0) | 1 (12.5) | 1 (1.5) | – |
| Tetrasiklin | 54 (94.7) | 7 (87.5) | 2 (3.0) | 5 (7.2) |
| Vankomisin | – | – | – | – |
| Teikoplanine | – | – | – | – |
| Rifampin | 56 (98.2) | 5 (62.5) | 3 (4.5) | 1 (1.4) |
| Klindamisin | 51 (89.5) | 5 (62.5) | 6 (9.1) | 5 (7.2) |
| Eritromisin | 33 (57.9) | 5(62.5) | 6 (9.1) | 1 (1.4) |

İzole edilen 200 *S. aureus* suşunda fenotipik olarak metisilin direnci CLSI'nin önerileri doğrultusunda oksasilin, sefoksitin disk difüzyon yöntemi ve oksasilin tuz agar tarama yöntemiyle saptanmıştır. 65 suşun hepsi disk difüzyon yöntemiyle hem oksasilin ve sefoksitin hem de oksasilin tuz agar tarama yöntemi ile dirençli saptanmıştır. Fenotipik yöntemlerle MRSA olarak tanımlanan 65 suşun genotipik olarak metisilin direncini göstermek amacıyla PCR yöntemiyle *mecA* gen tespiti yapılmıştır. MRSA suşlarının 61 (%93.8)'inde *mecA* geni pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Fenotipik olarak hem oksasilin hem de sefoksitin testi ile MRSA olarak tanımlanan 4 suşta genotipik olarak *mecA* geni saptanmamıştır. Ayrıca MSSA olarak tanımlanan 135 suşun da *mecA* geni araştırılmış ve hiçbirinde *mecA* geni saptanmamıştır.

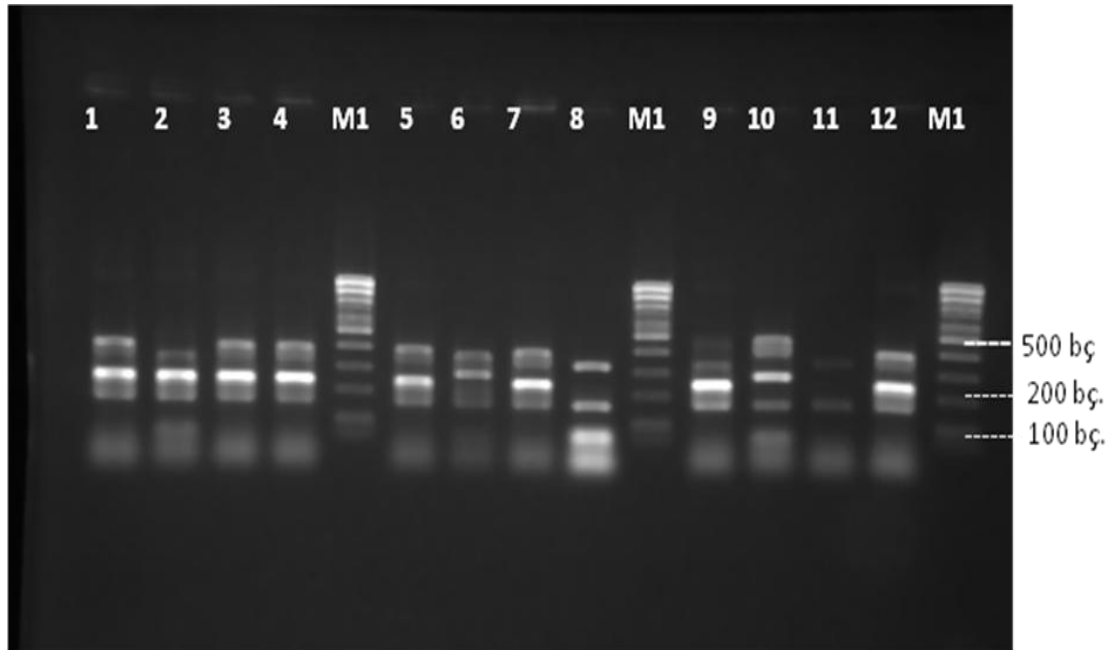


Şekil 1: MRSA suşlarında *Mec A* genlerinin PCR jel görüntüleri. (M1: 0.1-10kb DNA ladder, 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol; ATCC 43300, 3-8, 10-13: *Mec A* pozitif MRSA suşları, 9: *Mec A* negatif MRSA).

MecA geni pozitif bulunan suşların herbirinin *SCCmec* tipleri uygun primerler kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile *SCCmec* I (IA, IA benzeri), *SCCmec* II, *SCCmec* III (IIIA, III benzeri), *SCCmec* IV(IVA) şeklinde tiplendirildi. *SCCmec* PCR görüntüleri Şekil 2 ve 3'de gösterilmiştir.



Şekil 2: MRSA suşlarının SCCmec tiplerinin PCR jel görüntüleri. (M1: ØX174 DNA ladder, M2: 100 bç DNA ladder, 1:Negatif kontrol, 2-5: Kontrol suşlar (2, 4: Sccmec TipIII, 3: Sccmec Tip II, 5: Sccmec Tip IV) 6, 7, 8, 10 : Sccmec Tip IA benzeri, 9: Sccmec Tip III, 11: Sccmec Tip IV, 12: Sccmec Tip IVA).



Şekil 3: MRSA suşlarının SCCmec tiplerinin PCR jel görüntüleri. (M1: 100 bç DNA ladder, 5-8: Kontrol suşlar (5,7: Sccmec TipIII, 6: Sccmec Tip II, 8: Sccmec Tip IV) 1, 3, 4, 12: : Sccmec Tip III, 2: Tip III benzeri, 9, 10: Sccmec Tip I, 11: Sccmec Tip IV).

Çalışmaya alınan genotipik olarak *mecA* gen varlığı gösterilmiş olan 61 MRSA suşunun 37'si SCC*mec* Tip III, 9'u SCC*mec* Tip I, 5'i SCC*mec* Tip III benzeri, 6'sı SCC*mec* Tip IA benzeri, 2'si Tip IV, 1'i SCC*mec* Tip IVA ve 1'i de Tip IA olarak tanımlandı (Tablo 6).

Tablo 6: SCC*mec* tiplerinin *MecA* pozitif suşlardaki dağılımı.

| SCC <i>mec</i> | TipI | TipIA | TipIA benzeri | TipII | TipIII | TipIII benzeri | TipIV | TipIVA |
|--|---------|--------|---------------|-------|----------|----------------|--------|--------|
| <i>MecA</i>(+) MRSA (N=61) n(%) | 9(14.8) | 1(1.6) | 6(9.8) | – | 37(60.7) | 5(8.2) | 2(3.3) | 1(1.6) |

Yatan ve ayaktan izlenen hastalardan izole edilen *MecA* pozitif 61 suşun SCC*mec* tiplendirilmesi Tablo 7'de verilmiştir. Yatan hastalardan izole edilen *mecA* pozitif toplam 55 suşun 34'ü (%61.8) ve ayaktan izlenen hastalardan izole edilen 6 suşun 3'ü (%50) SCC*mec* TipIII olarak saptanmıştır.

Tablo 7: SCC*mec* tiplerinin yatan ve ayaktan izlenen hasta suşlarındaki dağılımı.

| SCC <i>mec</i> Tip | Yatan hasta n (%) | Ayaktan hasta n (%) |
|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| SCC <i>mec</i> Tip I | 8 (14.5) | 1 (16.7) |
| SCC <i>mec</i> Tip IA | 1 (1.8) | – |
| SCC <i>mec</i> Tip IA benzeri | 6 (10.9) | – |
| SCC <i>mec</i> Tip III | 34 (61.8) | 3 (50.0) |
| SCC <i>mec</i> Tip III benzeri | 4 (7.3) | 1 (16.7) |
| SCC <i>mec</i> Tip IV | 1 (1.8) | 1 (16.7) |
| SCC <i>mec</i> Tip IVA | 1 (1.8) | – |

SCC*mec* Tip III saptanan 37 suşun 15 (%40.5)'i yara örneklerinden izole edilirken 22 (%59.5)'si yara dışı örneklerden izole edilmiştir. SCC*mec* Tip I ve IA saptanan suşların tümü yara-dışı örneklerden izole edilirken, SCC*mec* Tip IV ve IVA saptanan suşların tümü yara örneklerinden izole edilmiştir. SCC*mec* Tiplerinin izole edildikleri örneklere göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: SCC*mec* tiplerinin izole edildikleri örneklere göre dağılımı.

| SCC<i>mec</i> Tip | Yara n (%) | Yara-dışı n (%) |
|--------------------------------|-------------------|------------------------|
| SCC <i>mec</i> Tip I | – | 9 (100) |
| SCC <i>mec</i> Tip IA | – | 1 (100) |
| SCC <i>mec</i> Tip IA benzeri | 3 (50.0) | 3 (50) |
| SCC <i>mec</i> Tip III | 15 (40.5) | 22 (59.5) |
| SCC <i>mec</i> Tip III benzeri | – | 5 (100) |
| SCC <i>mec</i> Tip IV | 2 (100) | – |
| SCC <i>mec</i> Tip IVA | 1 (100) | – |

SCC*mec* tiplerinin antibiyotik direnç oranları Tablo 9'da gösterilmiştir.

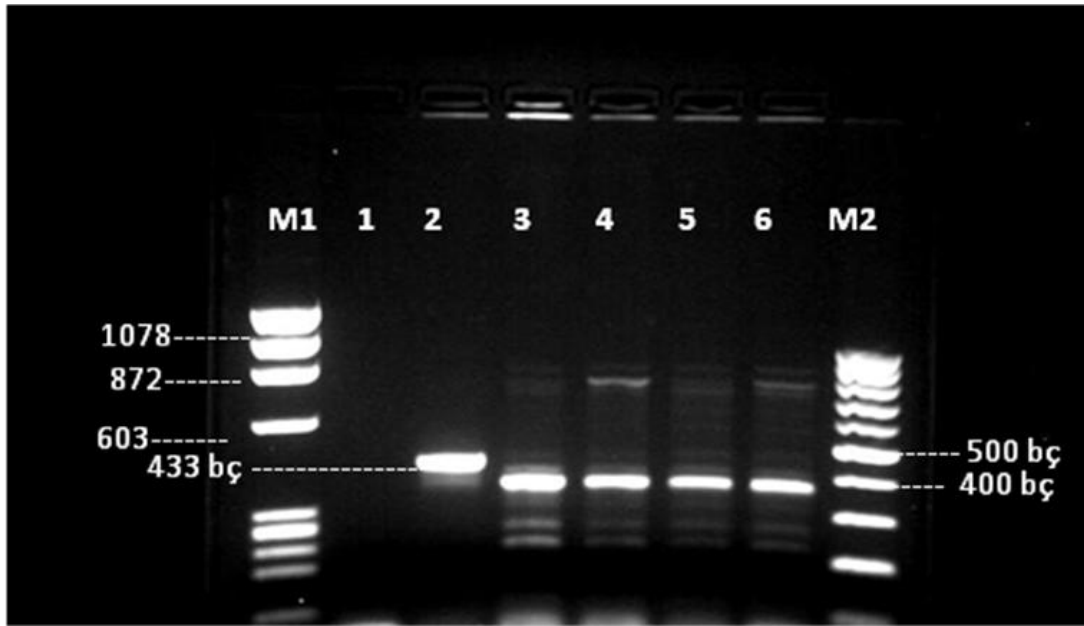
Tablo 9: SCCmec tiplerine göre antibiyotik direnç oranları.

| SCCmec (N) | SXT n (%) | C n (%) | CIP n (%) | CN n (%) | RA n (%) | AZM n (%) | CTX n (%) | ME n (%) | AMC n (%) | TE n (%) |
|----------------------------|--------------|------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Tip I (9) | – | – | 7 (77.8) | 7 (77.8) | 8 (88.9) | 4 (44.4) | 8 (88.9) | 8 (88.9) | 9 (100) | 9 (100) |
| Tip IA (1) | – | – | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tip IA Benzeri (6) | – | – | 6 (100) | 4 (66.7) | 6 (100) | 4 (66.7) | 6 (100) | 6 (100) | 6 (100) | 6 (100) |
| Tip III (37) | 4 (10.8) | 3 (8.1) | 33 (89.2) | 35 (94.6) | 36 (97.3) | 18 (48.6) | 35 (94.6) | 33 (89.2) | 33 (89.2) | 36(97.3) |
| Tip III Benzeri (5) | 1 (20) | 1 (20) | 4 (80) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) | 5 (100) |
| Tip IV (2) | – | – | 2 | 1 | – | 1 | 2 | 1 | 2 | – |
| Tip IVA (1) | – | – | 1 | – | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | – |

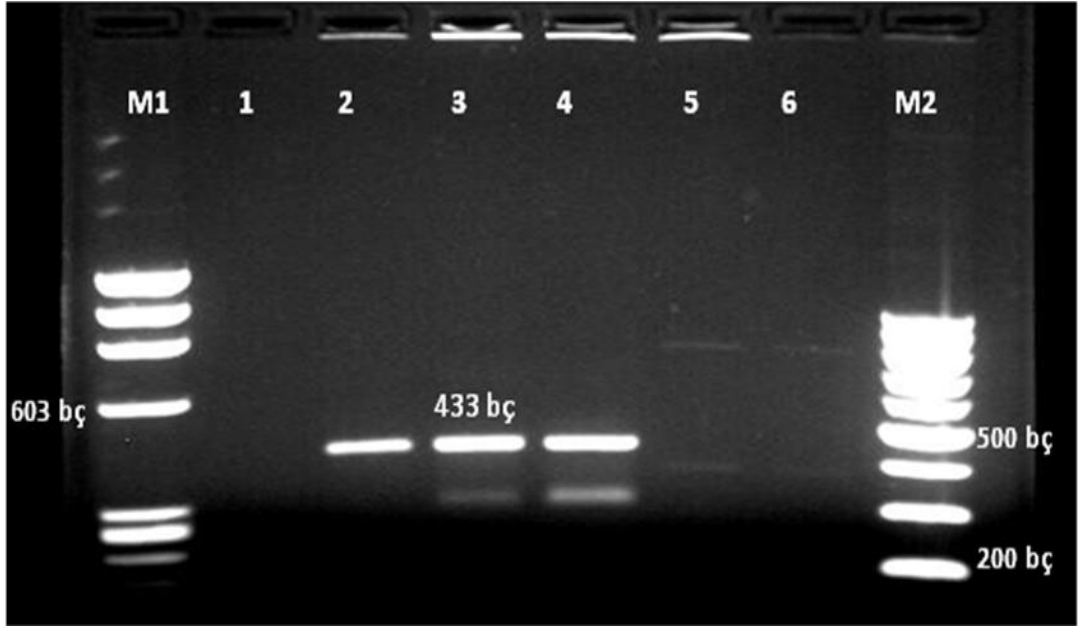
(SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, C: Kloramfenikol, CIP: Siprofloksasin, CN: Gentamisin, RA: Rifampisin, AZM: Azitromisin, CTX: Sefotaksim, ME: Meropenem, AMC: Amoksisilin-klavulonat, TE: Tetrasiklin)

Not: N< 5 verilerde % verilmemiştir.

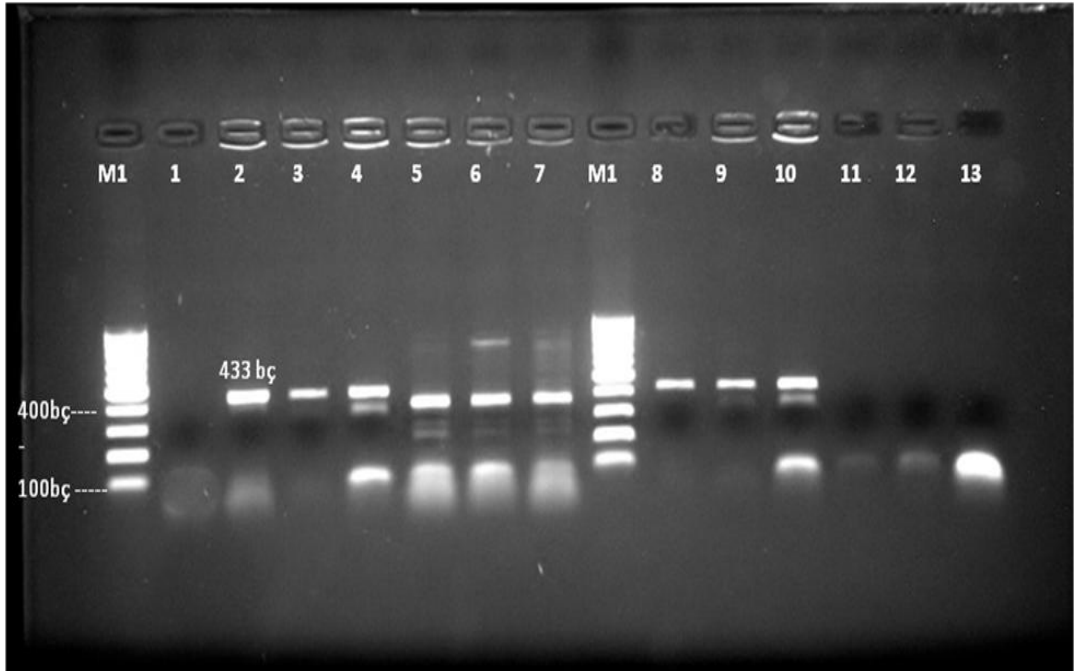
S. aureus suşlarının PVL gen amplifikasyonları için iki farklı primer seti içeren iki protokol uygulandı. Birinci protokolde Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak 55°C ve 58°C’lerde iki farklı bağlanma sıcaklığı denendi (Şekil:4-6). Ön çalışmalar sonrası protokole 58°C ile devam edildi ve PCR yöntemiyle 65 MRSA ve 135 MSSA izolatında *lukS/F-PV* geninin varlığı araştırıldı. Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılan ve 55°C’de bağlanma ısısı uygulanan PCR yöntemiyle çalışılan 65 MRSA izolatının 52 (%80)’sinde pozitif kontrolden daha kısa ampikon gözlenmiştir (Şekil 4). Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 58°C bağlanma ısısı uygulanılarak gerçekleştirilen PCR çalışmasında 200 *S. aureus* suşunun 2 (%1)’sinde pozitif kontrol ile benzer şekilde 433 bç’de ampikon izlenmiştir. İki suş PVL pozitif olarak değerlendirilmiştir. PVL pozitif olan izolatlardan 1’inin MRSA (%1.5), 1’inin ise MSSA’ya (%0.7) ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 5). Ön deneme görüntüleri Şekil 4 ve 6’da yer almaktadır.



Şekil 4: Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 55 °C bağlanma sıcaklığındaki PCR jel görüntüleri (M1: ØX174 DNA ladder, M2: 100 bç DNA ladder, 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol, 3- 6: ≈400 bç ampikon veren suşlar).



Şekil 5: Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 58 °C bağlanma sıcaklığındaki PCR jel görüntüleri (M1: ØX174 DNA ladder, M2: 100 bç DNA ladder, 1: Negatif kontrol, 2: Pozitif kontrol, 3, 4: PVL(+) suşlar, 5, 6: PVL (-) suşlar).



Şekil 6: Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri ile 55 °C ve 58 °C bağlanma sıcaklıklarındaki amplikonların eş zamanlı PCR jel görüntüleri (1- 7; 55 °C — 8- 13; 58 °C. M1 :100 bç DNA ladder, 1: Negatif kontrol, 2, 8: ATCC 25923, 3, 9 : 67 no'lu MRSA suşu, 4, 10: 13 no'lu MSSA suşu, 5, 11: 44 no'lu suş, 6, 12: 37 no'lu suş, 7, 13:23 no'lu suş).

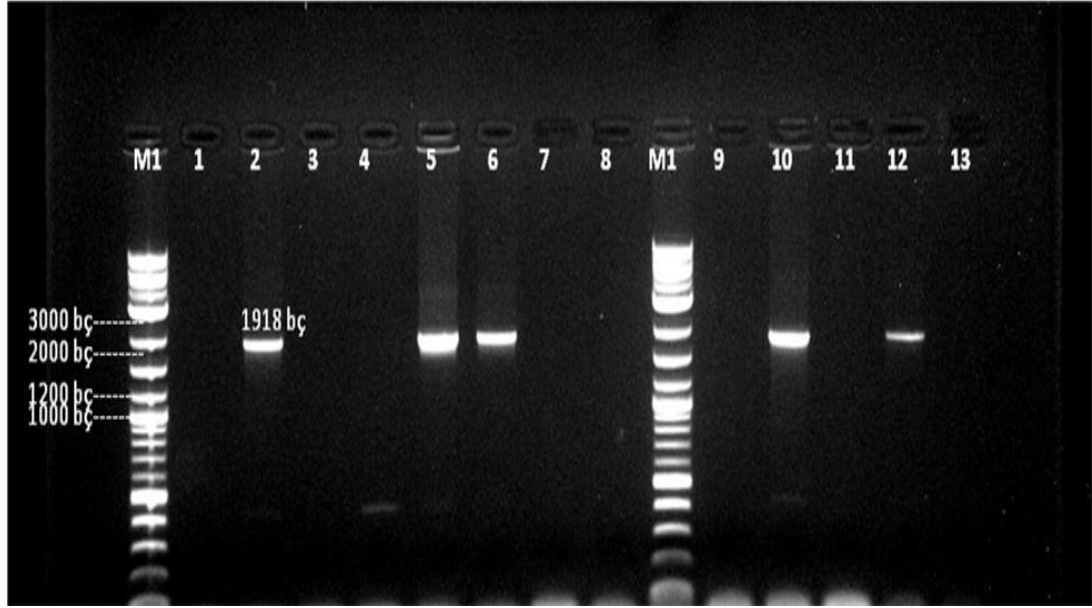
MRSA'lar ve MSSA'lar arasında PVL saptanan izolatların her ikisi de Dermatoloji polikliniğinden gönderilen yara örneklerinden izole edilmişlerdir. PVL pozitif MRSA suşu siprofloksasin, gentamisin, azitromisin, sefotaksim ve amoksisilin-klavulonata dirençli bulunmuştur. PVL pozitif MSSA suşu ise penisilin dışında çalışılan bütün antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. PVL pozitif MRSA suşu SCCmec tipIV olarak saptanmıştır. PVL pozitif MRSA ve MSSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 10: PVL(+) MRSA ve MSSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.

| | P | SXT | VA | C | CIP | CN | RA | AZM | CTX | ME | AMC | TEC | TE |
|-----------------------------|---|-----|----|---|-----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| PVL(+)MRSA (n:1) | R | S | S | S | R | R | S | R | R | S | R | S | S |
| PVL(+)MSSA (n:1) | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

(P:Penisilin, VA:Vankomisin, SXT:Trimetoprim/sülfametoksazol, AK:Amikasin, C:Kloramfenikol, CIP:Siprofloksasin, CN:Gentamisin, RA:Rifampisin, AMC:Amoksisilin-klavulonata, AZM:Azitromisin, TE:Tetrasiklin, CTX:Sefotaksim, TEC:Teikoplanin, R:Dirençli, S:Duyarlı)

Luk-S PV ve *luk-F PV* genlerini kapsayan 1918 bç'lik bölgenin amplifikasyonu için ikinci protokolde *PVLup* ve *PVLdn* primerleri kullanılarak 50°C ve 48°C olmak üzere iki farklı bağlanma sıcaklığı denendi. Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak pozitif saptanan 2 suş ve pozitif kontrol suşlarla birlikte toplam 30 suş, *PVLup* ve *PVLdn* primerleri kullanılarak 50°C bağlanma sıcaklığında çalışıldı. Pozitif kontrol suşlar ve Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak pozitif saptanan 2 suştan 1'i PVL pozitif saptandı (Şekil 7). Ön çalışmalar sonrası protokole 48°C ile devam edildi. Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak 58°C'de PVL pozitif saptanan iki izolat, PVL up-dn primerleri ile 48°C'de PVL pozitif saptanan suşlar ile aynıydı.



Şekil 7: *PVLup* ve *PVLdn* primerleri ile 48 °C ve 50 °C bağlanma sıcaklıklarındaki ampliconların eş zamanlı PCR jel görüntüleri (1-8; 48 °C _ 9-13; 50 °C. M1: 0.1-10kb DNA ladder, 1,9: Negatif kontrol, 2,10: ATCC 25923, 5,12 : 67 no'lu MRSA suşu, 6,11: 13 no'lu MSSA suşu, 3,13: 44 no'lu suş, 4,7,8 : PVL (-) suşlar).

SCC*mec* Tip IV ve IVA saptanan suşların antibiyotik direnç profili Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: SCC*mec* Tip IV saptanan suşların antibiyotik direnç profili.

| | SCC <i>mec</i> Tip IV (Üroloji) (n:1) | SCC <i>mec</i> Tip IV (Dermatoloji) (n:1) | SCC <i>mec</i> Tip IVA (Dahiliye) (n:1) |
|------------|--|--|--|
| P | R | R | R |
| SXT | R | S | S |
| VA | S | S | S |
| C | S | S | R |
| CIP | R | R | R |
| CN | S | R | S |
| RA | S | S | R |
| AZM | S | R | R |
| CTX | R | R | R |
| ME | R | S | R |
| AMC | R | R | R |
| TEC | S | S | S |
| TE | S | R | S |

(P:Penisilin, VA:Vankomisin, SXT:Trimetoprim/sülfametoksazol, AK:Amikasin, C:Kloramfenikol, CIP:Siprofloksasin, CN:Gentamisin, RA:Rifampisin, AMC:Amoksisilin-klavulonat, AZM:Azitromisin, TE:Tetrasiklin, CTX:Sefotaksim, TEC:Teikoplanin, R:Dirençli, S:Duyarlı)

TARTIŞMA

S. aureus izolatlarında görülen en önemli sorun, giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmesine rağmen prevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. HK-MRSA enfeksiyonlarının yanında TK-MRSA enfeksiyonlarının görülme sıklığında da önemli bir artış görülmektedir. TK-MRSA ve HK-MRSA'ların moleküler epidemiyolojisi ve antibiyotiklere duyarlılıkları birbirinden farklıdır (75).

Çalışmaya aldığımız MRSA suşlarının gönderilen servislere göre dağılımlarına bakıldığında; suşların % 67.0'sinin yoğun bakım ve cerrahi servislerden gelen örneklerden izole edildiği görülmektedir. Bu servislerde yatan hastaların uzun süre yatıyor olması, invaziv işleme diğer hastalardan daha fazla maruz kalması ve antibiyotik kullanımının daha sık olmasına MRSA suşlarının bu servislerde diğerlerine oranla daha fazla izole edilmesinin nedeni olabilir.

Çalışmamızda yatan hastalardan izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik direnç dağılımlarına bakıldığında; rifampin ve sefotaksimde %98.2 ile en yüksek direnç saptanırken tetrasiklin, amoksisilin-klavulonat ve meropenemde %94.7, siprofloksasinde %89.5, gentamisinde %87.7, azitromisinde %57.9 direnç saptanmıştır. En düşük direnç ise trimetoprim/sulfametoksazolde %8.8, kloramfenikolde %7.0 olarak tespit edilmiştir. Ayaktan izlenen hastalardan izole edilen MRSA suşlarından ise en yüksek direnç tetrasiklinde (%87.5) görülürken en düşük direnç kloramfenikol ve trimetoprim/sulfametoksazolde (%12.5) görülmüştür. Ayaktan ve yatan hastalardan izole edilen tüm MRSA suşlarında vankomisin ve teikoplanine karşı direnç saptanmamıştır.

Türkiye'de ve yurtdışında yapılmış çalışmalarda gentamisin direnci MRSA suşlarında %28-92, MSSA suşlarında ise %2-10 arasında bildirilmiştir (96-100). TMP-SXT'de direnç oranları MRSA suşlarında %2.5-74, MSSA'da ise %5-38 arasında bildirilmiştir (96, 98-100, 102). MRSA suşlarında siprofloksasine %17-95 ve MSSA suşlarında ise %2-4 arasında direnç saptanmıştır (96, 98-101, 103). Rifampine direnç, MRSA ve MSSA suşlarında sırasıyla %2.5-66 ve %0-17 olarak bildirilmiştir (96, 98-100, 102, 104).

MRSA’larda çoklu antibiyotik direnci görüldüğü için öncelikle suşlarının hızlı ve doğru tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığına göre uygun antibiyotiğin seçilmesi gerekmektedir. Metisiline dirençli stafilocokların, duyarlı olarak saptanması tedavinin yetersizliğine neden olurken, metisiline duyarlı stafilocokların dirençli saptanması da glikopeptid antibiyotiklerin gereksiz kullanımına ve tedavi maliyetinin artmasına yol açmaktadır (105, 106).

CLSI, *S. aureus*’larda metisilin direncini göstermede oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerini fenotipik test olarak önermektedir. CLSI disk difüzyon testine ek olarak oksasilin agar tarama testini de önermektedir. Bazı MRSA suşlarında heterojen metisilin direnci ekspresyonundan dolayı fenotipik metotlarla her zaman doğru olarak tanımlanamayabilir. Bu nedenle stafilocoklarda, metisilin direncini belirleyebilmek için PCR ile *mecA* geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat rutin laboratuvarlarda moleküler tekniklerin uygulanma zorlukları nedeniyle metisilin direnci fenotipik yöntemlerle gösterilmektedir (107, 108).

Çalışmamızda, *S. aureus* suşları izole edildikten sonra, disk difüzyon yöntemiyle oksasilin ve sefoksitin direncine ek olarak oksasilin agar tarama testine bakılmış ve 65 suşun tamamı MRSA olarak tanımlanmıştır. Daha sonra tüm suşlarda PCR ile *mecA* geni araştırılmış ve 61 suşun MRSA oldukları doğrulanmıştır. Başlangıçta MRSA izolasyonu için uygulanan oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yönteminde dirençli bulunan 4 suşa PCR tekniği ile *mecA* geni tespit edilememiştir. Bu sonuç; 4 suşun *mecA* geni taşımadığı halde normal PBP genlerinde modifikasyon, normal PBP’lerin aşırı ekspresyonu ya da stafilocokal beta laktamazların aşırı üretimi sonucu düşük düzeyde oksasilin direnci gösteren “Borderline MRSA” suşları olabileceğini düşündürmektedir (16, 70).

Fenotipik testlerde inkübasyon ısısı, NaCl konsantrasyonu, besiyeri, bakteri saklama koşulları ve inokulum yoğunluğu gibi invitro şartların direncin ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca stafilocoklarda *mecA* geni taşıdığı halde fenotipik olarak oksasilin ve sefoksitine duyarlı ya da düşük düzeyde dirençli görülen heterorezistan suşlar olduğu bilinmektedir (109, 110). Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada fenotipik yöntemlerle duyarlı bulunan ve MSSA olarak tanımlanan 135 suşa da PCR ile *mecA* gen varlığı araştırılmıştır. Suşların hiçbirisinde *mecA*

saptanmamıştır. Bu sonuç fenotipik yöntemlerle elde edilen sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur.

MecA geni, kromozomda Stafilokok Kaset Kromozom *mec* (*SCCmec*) olarak adlandırılan büyük ve hareketli bir eleman üzerinde yer alır. *SCCmec* tiplerinin belirlenmesi, *SCCmec* tiplerinin prevalansı, ülke genelindeki MRSA klonlarının takibi ve klinik ortamda MRSA suşlarının yayılımı hakkında bilgi edinmek için kullanılan bir yöntemdir. Genellikle HK-MRSA suşlarının *SCCmec* tip I, II, III, TK-MRSA suşlarının ise *SCCmec* Tip IV, V ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (111, 112). Önceki çalışmalarda, *SCCmec* tiplerinin MRSA izolatlarındaki dağılımı incelendiğinde, HK-MRSA izolatlarının büyük çoğunluğunun *SCCmec* Tip I, II veya III, TK-MRSA izolatlarının ise *SCCmec* Tip IV, V veya VI olarak bulunduğu görülmektedir (41, 84, 113, 114).

Hong Kong Halk Sağlığı Laboratuvar'ında TK-MRSA olduğu düşünülen 140 izolat incelenmiş ve *SCCmec* Tip IV %71.4 ve *SCCmec* Tip V %28.6 oranında bulunmuştur (114). Arakere ve ark. (115), Hindistan'da önemli bir nozokomiyal patojen olduğu için iki farklı hastanede izole edilmiş toplam 82 MRSA'da moleküler genotipleme yapmışlardır. Çalışmada multipleks PCR kullanılarak suşlardan 49 (%59.7)'unun *SCCmec* Tip III, 26 (%31.7)'sının Tip IIIA içerdiği saptanmıştır. Çin ve Tayvan'da iki hastaneden izole edilen 132 MRSA suşunun multipleks PCR yöntemi ile *SCCmec* tipi araştırılmış ve izolatların 126 (% 95)'sı *SCCmec* Tip III veya IIIA ve 2'sinde *SCCmec* Tip II varyant ve 1 suшта *SCCmec* Tip IV saptandığı bildirilmiştir. (116). Kılıç ve ark. (84), yaptıkları çalışmada HK-MRSA suşlarında %90.9 (40/44) oranında *SCCmec* Tip III, TK-MRSA suşlarında %40 (2/5) oranında *SCCmec* Tip IV saptamışlardır.

Yapılan çalışma sonuçlarına benzer olarak bizim çalışmamızda da, 61 MRSA suşunun 37 (%60.7)'sinin *SCCmec* tip III, 5 (%8.2)'inin Tip III benzeri *SCCmec* elemanı taşıdığı bulunmuştur. *SCCmec* tip III saptanan suşların 34'ü yatan hastalardan 3'ü ayaktan izlenen hastalardan izole edilirken, *SCCmec* tip III benzeri suşların 4'ü yatan hastalardan, 1'i ise ayaktan izlenen hastadan izole edilmiştir.. Ancak çalışmamızda, Tip III benzerinin yanısıra 6 (%9.8)'sının Tip IA benzeri *SCCmec* elemanı taşıdığı da saptanmıştır. Bu tip, multipleks PCR ile daha önce

belirtilen Tip IA ile aynı bantları içermektedir. Çalışmamızda Tip I, IA, III, IV ve IVA *SCCmec* tipleri de saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Tekeli ve ark. (117) çalışmalarında, yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 100 adet HK-MRSA izolatından 84 (%84)'ünde *SCCmec* Tip III, birer suşta ise Tip IA, TipII ve Tip IIIA olduğunu saptamışlardır. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da saptanmıştır (115, 116).

Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde 2004-2005 tarihleri arasında yatan hastalardan alınan klinik örneklerden izole edilmiş 110 MRSA suşunun antibiyotik duyarlılıkları, *mecA* gen varlığı ve *SCCmec* tiplerini araştırmışlardır. Suşlar; ağırlıklı olarak (%71) yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerin klinik örneklerinden izole edilmiştir. Suşların tümünde *mecA* geni pozitif bulunmuş ve 68 (%61.8)'inde *SCCmec* Tip III, 38 (%34.5)'inde *SCCmec* varyant IIIB ve 3 (%2.7)'ünde *SCCmec* Tip IV tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada 1 suşta *mecA* geni pozitif olup, *SCCmec* tipleri arasında sınıflandırılmadığı belirtilmiştir (113). Çalışmalarda *mecA* geni taşıdığı halde multipleks PCR yöntemiyle hiç bant vermeyen veya elde edilen bant paterninin herhangi bir tiplerle uyum sağlamaması halinde bu suşlar "Tanımlanamayan" veya "Sınıflandırılmayan" grubuna dahil edilmiştir (93, 113).

Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada, altı farklı coğrafik bölgedeki sekiz üniversite hastanesinden izole edilen 54 MRSA izolatının tümünde *SCCmec* Tip III gösterilmiştir (112). Türkiye genelini yansıtan bu çalışmadaki bulgular ile çalışmamızda *SCCmec* Tip III baskınlığı ile ilgili sonuçlarımız paraleldir. Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yapılan diğer bir çalışmada ise, yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 9 MRSA izolatının daha önce bildirilen Tip IIIA ve IIIB'den farklı bir Tip III varyantı taşıdığı saptanmıştır (118).

HK-MRSA izolatları farklı direnç belirleyicileri taşımaları ve suşların içerdiği *SCCmec* tipi nedeniyle genellikle çoklu ilaç dirençlidir. Hastane kökenli suşlarda en sık bulunan *SCCmec* tipleri Tip II ve III'tür. Bu tiplerde daha fazla direnç elemanı bulunduğu için bunları taşıyan klonal soylar da daha dirençlidir. *SCCmec* Tip I, IV, V sadece beta-laktam direncini kodlarken, *SCCmec* Tip II ve III çoklu ilaç direncine yol açar. Bunun nedeni, Tip II ve III elemanların kaset içine entegre olmuş plazmidler (pUB110, pI258 ve pT181) ile bir transpozon (Tn 554) aracılığıyla ek

direnç genleri taşıyıcılarıdır. Plazmid pUB110, kanamisin, tobramisin, bleomisin direncinden sorumlu ant(4') genini; pI258 penisilin ve ağır metal direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşıırken, Tn 554 ise indüklenebilir MLSb tipi dirence yol açan ermA genini taşımaktadır. Farklı coğrafi bölgelerde farklı SCCmec tiplerinin baskın olduğu ve farklı antibiyotik direnç paterni gösterdikleri bildirilmiştir (8, 119).

Çalışmamızda değerlendirilen suşlarda baskın tip olarak saptanan SCCmec Tip III, HK-MRSA izolatlarında en sık tespit edilen kromozomal kaset tiplerindedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da SCCmec Tip III'ün baskın olduğu görülmektedir (112, 113, 117, 118). SCCmec Tip III elemanı, mec geni yanı sıra tetrasiklin ve civa direncinden sorumlu pT181 plazmidini, ermA geninin taşıdığı MLS direncinden sorumlu Tn 554 ve kadmiyum direncinden sorumlu Tn 554 transpozonlarını taşımaktadır. Bu direnç genlerine sahip izolatlar, sıklıkla antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermektedir (120). Akoğlu ve ark. (113) yaptıkları çalışmada; çoğunlukla yoğun bakım üniteleri ve cerrahi servislerde yatan hastaların püü ve kan örneklerinden izole edilen HK-MRSA suşlarının çoğunda SCCmec III veya varyant Tip IIIB saptanmış ve bu suşlarda çoklu ilaç direnci gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada da SCCmec III tipi suşların çoklu ilaç direncine sahip oldukları bildirilmiştir (116). Bizim çalışmamızda da SCCmec Tip III ve SCCmec Tip III benzeri saptanan suşların antibiyotik duyarlılıklarına baktığımızda, çoklu antibiyotik direnci gözlenmiştir.

Son yıllarda, HK-MRSA suşlarının yanı sıra, ağır nekrotik enfeksiyonlar yapan TK-MRSA'lar da insan hayatını tehdit etmeye başlamıştır. TK-MRSA izolatlarının HK-MRSA izolatlarından farklı olarak SCCmec Tip IV, V ve VI elemanlarını taşımaları; az sayıda direnç genine sahip olmaları ve çoğu antibiyotiğe duyarlı olmalarını sağlamaktadır. Fakat SCCmec IV MRSA suşlarının genetik elemanının küçük olması aynı zamanda diğer *S. aureus* suşlarına aktarılmasını da kolaylaştırmaktadır (84, 121).

Moran ve ark. (55) SCCmec Tip IV saptadıkları MRSA izolatlarının %95'inde klindamisine, %6'sında eritromisine, %60'ında florokinolona, %100'ünde rifampine %100'ünde trimetoprim-sulfametoksazole ve %92'sinde tetrasikline duyarlı bulmuşlardır. Cezayir'de yapılan bir çalışmada ise; SCCmec IV ve SCCmec IVA saptanan 45 MRSA suşunun 5'i HK-MRSA olup bu suşlarda çoklu antibiyotik

direnci saptanmıştır (122). Çalışmamızda SCCmec IV tipi saptanan 2 suştan 1'i Üroloji servisinde yatan hastanın yara örneğinden, diğeri ise Dermatoloji polikliniğinde ayaktan hastanın yara örneğinden izole edilmiştir. SCCmec IVA tipi ise yatan hastanın yara örneğinden izole edilmiş 1 suşta saptanmıştır. Bu suşların tümü yara örneğinden izole edilmiştir ve bu suşlarda çoklu antibiyotik direnci görülmüştür. SCCmec IV ve IVA saptanan suşların tümünde siprofloksasine, sefotaksime ve amoksisilin-klavulonata direnç saptanmıştır.

Japonya'da yapılan bir çalışmada, sağlıklı çocukların nazal sürüntü örneklerinden izole edilen 231 *S. aureus* suşunun 44'ü MRSA olarak belirlenmiştir. MRSA suşlarının 11'i SCCmec IIA, 19'u SCCmec IIB, 14'ü ise SCCmec IV olarak tespit edilmiştir (40). Florida-Miami'de yapılan bir çalışmada; 202 MRSA suşunda multiplex PCR yöntemiyle SCCmec tipleri araştırılmıştır. Suşların 107'sinde SCCmec Tip II, 73'ünde SCCmec Tip IV, 5'inde SCCmec Tip I, 2'sinde SCCmec TipIII, 1'inde SCCmec IIIA saptanmış ve 4 suşta ise tiplendirme yapılamamıştır (123). Bu çalışmaların bizim çalışmamızdan farkı SCCmec Tip IV ve Tip II'nin ağırlıklı olarak saptanmış olmasıdır.

Tekeli ve ark. (117) çalışmalarında HK-MRSA izolatlarında SCCmec tip IV belirlenmiştir. Başka bir çalışmada da; kan örneklerinden izole edilen HK-MRSA suşlarının %60'ında SCCmec Tip IV saptanmıştır (124). Strandén ve ark. (125) 4 yıl boyunca izole ettikleri 66 HK-MRSA ve 11 TK-MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada; HK-MRSA suşlarının %43.9'unun, TK-MRSA izolatlarının ise %36.4'ünün SCCmec tip IV/IVA taşıdığını saptamışlardır. Bu çalışma, SCCmec tip IV'ün TK-MRSA gibi HK-MRSA suşlarında da taşınabileceğini göstermektedir. Kore' de yapılan diğer çalışmada; MRSA bakteriyemi enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen 78 suşun 9'unun SCCmec tip IVA taşıdığı saptanmıştır. Bu suşların 6'sının HK-MRSA ve 2'sinin TK-MRSA olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışmadan elde edilen sonuçları değerlendirdiklerinde SCCmec Tip IVA'nın aslında TK-MRSA için kesin bir gösterge olmadığını ve klonal olarak toplumla hastane arasında yayıldığını öne sürmüşlerdir (126). Cezayir'de HK-MRSA suşlarında SCCmec Tip IV'ün ağırlıklı olarak görülmesi bir toplumsal klonun hastane salgını yapmasıyla açıklanmıştır (122).

SCC*mec* tip IV deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıyla ilişkili görülmektedir (119). Gülmez ve ark. (127) yaptıkları çalışmada; SCC*mec* tip IV saptanan MRSA suşlarının %3.1'inin deri- yumuşak doku enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu grlmştir. Bizim alışmamızda da Tip IV ve IVA saptanan suşların yara örneklerinden izole edilmiş olması benzerlik göstermektedir.

Nekrotizan enfeksiyonlara neden olan TK-MRSA, HK-MRSA suşlarına göre SCC*mec* Tip IV ve PVL toksinini daha sık oranda taşıtmaktadır. PVL, zellikle MSSA suşlarında saptanmasına rağmen MRSA'larda da tespit edilebilmektedir (29, 121). Bu suşların toplumda yaygın olarak bulunan ve PVL taşıyan MSSA izolatlarına SCC*mec* Tip IV girmesi ile ortaya çıktığı dşnlmektedir. Bu düşünceye ek olarak; hastane kökenli izolatların PVL sentez genleri kazanıp toplumda yayılımı veya toplumda bulunan MSSA suşlarının hem PVL hem de SCC*mec* Tip IV kazanması gibi hipotezler de bulunmaktadır. PVL pozitif MRSA izolatları, özellikle çocuklarda nekrotizan pnömoni ve *S. aureus*'a bağlı ağır cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (8).

Cercenado ve ark. (41) Acil Servis'e başvuran hastalardan izole ettikleri ve ten fazla antibiyotik grubuna dirençli olarak buldukları 53 MRSA izolatının 13'ünde (%24) PVL pozitifliği saptamışlardır. PVL pozitif suşların hepsi TK-MRSA olup 11'i deri ve yumuşak doku enfeksiyon örneklerinden izole edilmiştir. SCC*mec* tipi ise SCC*mec* IV olarak saptanmıştır. Hong Kong'ta yapılan başka bir prospektif çalışmaya pürülan deri ve yumuşak doku enfeksiyonları olan 298 hasta dahil edilmiştir. Tüm TK-MRSA izolatları arasında %10.4 (13/125) ve abselerin %5 (12/241)'inde PVL pozitif bulunmuştur. PVL pozitif 13 suştan 10'unda SCC*mec* Tip IV, 3'ünde ise SCC*mec* TipV saptanmıştır (128).

Fransa'da, *S. aureus*'un neden olduğu deri enfeksiyonu olan 229 hasta suşuyla yapılan çalışmada, 97 (%42.5) PVL pozitifliği saptanmıştır. 53 folliküler enfeksiyonun (follikülit, fronkül, karbonkül) 39 (%74)'unda PVL pozitif saptanırken 131 nonfollikler enfeksiyonun 16 (12%)'sında PVL pozitif saptanmıştır. PVL pozitif *S. aureus* suşlarının özellikle foliküler deri enfeksiyonları ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (129).

Çalışmamızda PVL pozitiflik oranı %1 olarak saptanmıştır. PVL pozitif suşlardan birisi SCC*mec* Tip IV taşırken, diğeri MSSA olarak tanımlanmıştır. PVL

pozitif 2 suşun da Dermatoloji kliniğinden gönderilen yara örneğinden izole edilmiş olması SCCmec Tip IV ve PVL deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilgisini desteklemektedir. SCCmec Tip IV ve PVL genini birlikte taşıması ve ayaktan hastanın yara örneğinden izole edilmesi bu suşun TK-MRSA suşu olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda PVL geni taşıyan MSSA izolatının saptanmış olması PVL pozitif MRSA'ya kaynak olabileceği için önemlidir (130).

Sağlam deriden penetre olabilen PVL pozitif suşların neden olduğu enfeksiyonların komplikasyonlarına daha sık rastlanmakta ve mortalite oranları daha yüksek seyretmektedir (49). PVL pozitif suşların yaptığı pnömonilerin incelendiği bir çalışmada; daha önce sağlık sorunu olmayan, PVL pozitif suşla enfekte 8 hastada hemorajik nekrotizan pnömoni tanısı konulmuş ve bunlardan 6'sı ölümle sonuçlanmıştır (49). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da; PVL pozitif saptanmış 3 suş ciddi nozokomiyal enfeksiyonla ilişkili bulunurken, deri ve yumuşak dokudan izole edildiği bildirilen 7 suşun 4'ünün altta yatan hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden izole edildiği bildirilmiştir (127).

İngiltere'de, PVL geninin stafilokokal hastalıklarda dağılımını saptamak için seçilen 470 izolattan 23'ünde (%4.9) PVL pozitif saptanmıştır. PVL pozitif 23 izolatın 15'ini (%65) deri ve yumuşak doku örneklerinden, 4'ü pnömonili olgulardan, 2'si yanık enfeksiyonlarından, 1 tanesi haşlanmış deri sendromlu 1 tanesi de bakteriyemili hastalardan izole edilmiştir. PVL pozitifliği, özellikle abse olmak üzere çoğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (38).

Lina ve ark. (30), 172 *S. aureus* izolatında PVL genlerini PCR yöntemi ile incelemiştir. Fronkülle ilişkili izolatların %93'ünde, tamamı toplum kaynaklı ağır nekrotizan pnömoniyle ilişkili izolatların %85'inde PVL saptanmıştır. İnfektif endokardit, mediastinit, hastane kökenli pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, enterokolit gibi enfeksiyonlar ve toksik şok sendromundan sorumlu suşlarda PVL tespit edilememiştir. Çalışmada, PVL'nin esas olarak deri ya da mukozayı içeren nekrotik lezyonlarla ve toplum kaynaklı şiddetli nekrotizan pnömoniyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Aires de Sousa ve ark. (131) hastane kaynaklı MSSA izolatlarında PVL pozitifliğini %35 oranında saptamışlardır.

Yunanistan'da 2001-2003 yılları arasında yatan ve poliklinik hastalarından izole edilen 1058 *S. aureus* suşunda PVL pozitifliği 287 (%27) suşta saptanmıştır. PVL pozitif suşların %45'i MRSA, %12'si MSSA olduğu belirlenmiştir. TK-MRSA'larda %72, HK-MRSA'larda %23, poliklinik hastalarında %20, yatan hastadan %5 oranında PVL pozitifliği saptanmıştır. İzole edilen suşlar poliklinik hastalarından deri ve yumuşak doku enfeksiyonundan, yatan hastalarda ise cerrahi yara ve protez cihaz örneklerinden elde edilmiştir (132).

Ellington ve ark. (133) da, İngiltere ve İrlanda'da bakteriyemili yatan hastalardan izole edilen 244 *S. aureus* suşunun 4(%1.6)'ünde PVL pozitifliği saptamışlardır. PVL pozitif suşların hepsi MSSA iken 88(%36)'i MRSA olan suşların hiçbirisinde PVL pozitifliği saptanmamıştır. PVL pozitif suşlar deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen 320 *S.aureus* izolatında SCCmec ve PVL araştırılmıştır. İzolatların 249(%78)' u MRSA ve 71(%17)'i MSSA olarak belirlenmiştir. MRSA izolatlarının %98'inde PVL pozitifliği ve SCCmec tip IV saptanırken, MSSA izolatlarının %42'sinde PVL pozitifliği saptanmıştır (55).

Fransa'da yapılan bir çalışmada ise; deri ve yumuşak doku enfeksiyonlu ayaktan ve yatan hastalardan izole edilen 22 MRSA suşunda % 31 oranında, 6 TK-MRSA suşunun hepsinde (%100) PVL pozitifliği bildirilmiştir (39).

Bu çalışmalarda PVL %1.6 ile %100 arasında değişen oranlarda pozitif saptanmış olmasına rağmen ülkemizde ve yurtdışında yapılan bazı çalışmalarda PVL pozitifliğine rastlanmamıştır (39, 40, 55, 131-134).

Budimir ve ark. (134) kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olmuş 82 MRSA suşunun hiçbirisinde PVL pozitifliğine rastlamamışlardır. Hisata ve ark. (40) da 231 *S.aureus* suşunun 44'ünü MRSA olarak tanımlamışlar ve bu suşların hiçbirisinde PVL pozitifliği saptamamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde klinik örneklerden izole edilen 55 MRSA ve 79 MSSA suşunda PVL varlığı araştırılmıştır. Çalışmada MRSA kökenlerinde PVL pozitifliği saptanmamış, buna karşın 2005 yılına ait 40 MSSA suşunun 2'sinde (%5), 2006 yılına ait 39 MSSA suşunun 4'ünde (%10.3) PVL pozitifliği saptandığı bildirilmiştir (42).

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 130 MRSA suşunun 2 (%1.5)'sinde, 20 MSSA suşunun 1 (%5)'inde PVL pozitifliği saptanmıştır. PVL pozitif MRSA suşlarından biri yara örneğinden diğeri kan kültür örneğinden ve PVL pozitif MSSA suşu ise idrar örneğinden izole edilmiştir. PVL varlığının tespitinin PVL pozitif *S. aureus*'un yayılmasını önlemek açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (135). Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji laboratuvarında farklı klinik örneklerden izole edilen 147 *S. aureus* suşunun 6'sında (%4.0) PVL tespit edilmiştir (136). Akoğlu ve ark. (113) 110 MRSA suşunun 14'ünde (%12.7) ve HK-MRSA suşlarında önemli oranda PVL pozitifliği saptamışlardır. Tekeli ve ark. (117) yaptıkları çalışmada ise 100 adet HK-MRSA izolatında PVL pozitifliğine rastlamamışlardır.

Ülkemizde ve yurtdışında yapılan çalışmalara bakıldığında farklı PVL pozitiflik oranlarının bildirilmesi öncelikle MRSA ve MSSA suşlarındaki PVL pozitiflik oranının coğrafi bölgeye göre değişiklik göstermesine (37) bağlanabileceği gibi kullanılan primerlerin farklılığından veya moleküler yöntemdeki farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca PVL'yi kodlayan genlerin diğer lökositinleri kodlayan genlerle yüksek oranda homoloji gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenlerle çalışma sırasında farklı primer seçimi ve termal döngü koşullarından kaynaklanan yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların alınabileceği bildirilmektedir. Bunu azaltmak için farklı primerlerle sonuçların doğrulanması önerilmektedir (93).

Bizim çalışmamızda bu öneriler dikkate alınarak farklı primer setleri ve farklı PCR koşulları uygulanmıştır.

Karahan ve ark. (93) yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 321 adet *S. aureus* suşunda (%84.4'ü MRSA; %76.9'u HK-MRSA) PVL pozitifliğini araştırmışlardır. Çalışmada, iki farklı primer seti ve her set için farklı bağlanma sıcaklıkları kullanılarak, primer seçiminin ve termal döngü koşullarının PCR ile PVL pozitifliğine etkileri araştırılmıştır. luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri ile 55°C'de *S. aureus* izolatlarının 161 (%50.2)'inde amplikon elde edilirken, 58°C'de sadece 5 (%1.6)'inde amplikon elde edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada yapılan dizi analizi ile 58°C'de elde edilen amplikonların PVL ile uyumlu olduğunun saptandığı belirtilmiştir ve PVL için kullanılan, luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri için

özellikle düşük bağlanma ısıları kullanıldığında hatalı bağlanmalar sonucunda, yanlış pozitif sonuçlar alınabileceğine dikkat çekilmiştir (93)

Karahan ve ark. (93) çalışmasındaki bu veriden yola çıkarak bizim çalışmamız da; luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri ile 65 MRSA suşunun hepsinde PCR hem 55°C hem de 58°C bağlanma sıcaklıkları ile yürütülmüştür. Yapılan bu ön deneme çalışmalarında 65 MRSA suşunun 52 (%80)'sinde beklenen bandın (433bç) yaklaşık 50-100bç. altında ampliconlar elde edildi. Bağlanma sıcaklığı 58°C'ye yükseltildiğinde PVL pozitifliği oranında [65 MRSA suşunun 1 (%1.5)'inde] belirgin bir azalma görülmüştür. Ancak gerçek pozitiflik için dizi analizi yapılması uygun olacaktır.

Birçok çalışmada PVL pozitifliğini saptamada en yaygın kullanılan yöntem PCR 'dir. PVL araştırmalarında, gerçek PVL oranını saptayabilmek için çalışma protokollerinin optimizasyonu yapılmalıdır.

Çalışmamızda 55°C bağlanma sıcaklığı kullanarak saptadığımız ampliconların 58°C kullandığımızda saptadıklarımıza oranla daha kısa oldukları görülmüştür (Resim 5) Ancak değerlendirdiğimiz izolatlarda gerçek PVL pozitifliğininin saptanması için gen bölgesinin doğrulanması gerekmektedir.

PVL için kullanılan diğer primer seti PVLup ve PVLdn olup daha önce Hisata ve ark.(40) tarafından kullanılmıştır. Karahan ve ark.'nın (93) Hisata ve ark. (40) çalışmasındaki primerleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında; 321 *S. aureus* izolatının hiçbirinin (pozitif kontrol suşu hariç) 50°C'de amplicon vermediği, sıcaklığın 48°C'ye indirildiğinde 5 (%1.6) klinik izolatta PVL pozitifliği saptandığı bildirilmiştir. Bu izolatların da luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri ile 58°C'de PVL pozitif bulunan suşlar ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada bu primerlerin yüksek bağlanma sıcaklıklarında PVL pozitifliğini saptamada yalancı negatif sonuçlara yol açabildiği vurgulanmıştır (93). Karahan ve ark.'nın (93) çalışma verileri dikkate alınarak bizim çalışmamızda hem 50°C hem de 48°C' de PVLup ve PVLdn primerleri ile ön çalışmalar yapılmıştır. Yapılan ön deneme çalışmalarında Karahan ve ark. (93) sonuçlarına benzer sonuçların gözlenmesi üzerine PVLup ve PVLdn primerleri için PCR protokolü 48°C bağlanma ısısı ile yürütüldü.

Bizim çalışmamızda PVLup ve PVLdn primerleri ile yapılan 48°C'de PVL pozitif saptanan suşlar luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri kullanılarak 58°C'de PVL

pozitif saptanan iki izolat ile aynıydı. PVLup ve PVLdn primerleri 50°C’de sınırlı sayıda suşta (30 MRSA) denenmiş olsa da kontrol suşumuzla birlikte PVL pozitif MRSA suşunda pozitiflik saptanırken, PVL pozitif MSSA suşunda 50°C bağlanma ısısında amplikon gözlenmemiştir. Bu bakımdan Karahan ve ark. (93) tarafından yapılan çalışmadaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Günümüzde MRSA suşlarının çoklu antimikrobiyal direnç göstermesi stafilokok enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte; PVL pozitif suşların nozokomiyal salgınlar oluşturma potansiyeli de zamanla daha dirençli ve daha virülan *S. aureus* suşlarının ortaya çıkmasına yol açacaktır (131, 137).

Tristan ve ark. (138) dünya genelinde 17 ülkeden toplanan 469 PVL pozitif TK-MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada tüm suşlar trimetoprim- sülfametoksazol, glikopeptidler ve linezolidde duyarlı olarak bulunmuştur. Suşların genelde birçok antimikrobiyal ajana duyarlı olduklarını fakat tetrasiklin ve fusidik aside dirençli suşların saptandığı da bildirilmiştir. Başka bir çalışmada PVL saptanan 4 suştan biri penisilin ve fusidik aside dirençli, diğer 3 suş test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur (133). Cezayir’de yapılan araştırmada, 45 PVL pozitif HK-MRSA suşunun 5’inde çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. 43 suşun 32 (% 73)’si tetrasikline, 11 (% 25)’i eritromisine, 7 (%16)’si ofloksasine, 5 (%11.3)’i klindamisine, 3 (% 7)’ü gentamisine, 1 (% 2.3)’i kloramfenikole ve 1 (% 2.3)’i rifampisine dirençli bulunmuştur (122). Çalışmamızda Dermatoloji polikliniğinden gönderilen yara örneğine ait PVL pozitif MRSA suşu çoklu dirence sahiptir. PVL pozitif MSSA suşu ise penisilin dışında tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada hem MRSA hem de MSSA suşlarında toplam PVL varlığı %1 olarak saptanmıştır. Bu pozitif suşların biri MRSA, diğeri MSSA idi. MRSA suşunun SCC_{mec} TipIV olarak tanımlanması ve ayaktan izlenen bir hastanın yara yeri sürüntü örneğinden izole edilmiş olması önemli bulunmuştur. Bu bulgu literatür bilgileri ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

S. aureus hem yatan hastalarda hem de ayaktan izlenen hastalarda önemli bir enfeksiyon etkenidir. PVL pozitif MRSA suşları çoklu antibiyotik direnci bulundurmaları nedeniyle önemlidir. Hem yatan hem de ayaktan izlenen hastalarda *S. aureus* enfeksiyonlarında, PVL varlığının araştırılması hem uygun tedavi planlaması hem de bu suşların toplumda yayılımının kontrol edilmesi açısından

önemli olduğu düşünölmüştür. Ayrıca MRSA suşlarının SCC*mec* tiplerinin belirlenmesi, ölkemizde baskın klonun belirlenmesi ve buna yönelik önlemlerin alınması açısından önemlidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Çalışmaya alınan 200 *S.aureus* suşu 65 (% 32.5) MRSA ve 135 (% 67.5) MSSA olarak tanımlandı.

2- MRSA suşları, en fazla Anestezi ve Yoğun Bakım (%35.4) ile Kardiyovasküler Cerrahi (%15.4), MSSA suşları ise en fazla Dermatoloji (%31.9) kliniğinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir.

3- MRSA suşlarının 21 (%32.3)'i yara örneklerinden, 44 (%67.7)'ü yara-dışı örneklerden izole edilirken, MSSA suşlarının 79 (%58.5)'u yara örneklerinden 56 (%41.5)'sı yara dışı örneklerden izole edilmiştir. MSSA suşları; yara örneklerinde yara-dışı örneklere göre daha fazla izole edilirken, MRSA suşları yara-dışı örneklerde yara örneklerine göre daha fazla izole edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4- MRSA suşlarının 57'si (%87.7) yatan hastalardan, 8'i (%12.3) ayaktan izlenen hastalardan, MSSA suşlarının ise 66'sı (%48.9) yatan hastalardan, 69'u (%51.1) ayaktan izlenen hastalardan izole edilmiştir. MSSA suşlarının izolasyon oranı yatan ve ayaktan izlenen hasta örneklerinde benzer bulunurken; MRSA suşları yatan hasta örneklerinden daha fazla izole edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

5- Yatan hastalardan izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik direnç dağılımlarına bakıldığında; en yüksek direnç oranı penisilin (%100), rifampin (%98.2) ve sefotaksim (%98.2) bulunurken, ayaktan izlenen hastalardan izole edilen MRSA suşlarında bu oranlar penisilin için %100, ve tetrasiklin için %87.5 bulunmuştur.

6- Fenotipik yöntemlerle MRSA olarak tanımlanan 65 suşun 61'(%93.8) inde *mecA* geni pozitif bulunmuştur.

7- *MecA* geni pozitif bulunan 61 MRSA suşunda en yüksek oranda SCC*mec* TipIII 37 (%60.7) tanımlanırken, SCC*mec* TipII suşların hiçbirisinde tanımlanmamıştır.

8- Luk-PV-1 ve luk-PV-2 primerleri kullanılarak ve amplifikasyonda 58°C bağlanma ısısı uygulanarak PCR yöntemiyle çalışılan 200 adet *S. aureus* izolatu arasında *lukS/F-PV* geni 2 izolatta (%1) pozitif olarak tespit edildi.

9- PVL up-dn primerleri ile 48°C bağlanma ısısı uygulandığında 2 suşta PVL pozitifliği saptandı.

10- MRSA'lar ve MSSA'lar arasında PVL pozitif saptanan izolatların her ikisi de Dermatoloji polikliniğinden gönderilen yara örneklerinden izole edilmişlerdir.

11- PVL pozitif MRSA suşunun SCC_{mec} TipIV olarak tanımlanması ve ayaktan izlenen bir hastanın yara yeri sürüntü örneğinden izole edilmiş olması önemli bulunmuştur.

PVL, *S. aureus*'un çoklu antibiyotik direncine neden olan ve tedavide güçlükler yaşatan bir virulans faktörüdür. Bu sebeple, PVL pozitif suşların araştırılması, toplum ve hastanede bu suşların yayılımının engellemesi ve önlem alınması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994;32:407-415.
2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Eng J Med 1998;339:520-532.
3. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2155-2161.
4. Gonzalez BE, Martinez-Aguilar G, Hulten KG, Hammerman WA, Cossbu J, Avalos-mishaan A, Mason EO, et al. Severe staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatrics 2005;115:642-648.
5. Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988;1:173-186.
6. Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF. Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:2568-2571.
7. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed. Washington: DC, 2003:284-404.
8. Gülay Z. Gram pozitif bakteri infeksiyonları: Direnç ve epidemiyoloji. Ankem Derg 2008;22 (2):276-286.

9. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000:2069-2092.
10. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Gram-Positive Cocci. In: Washington C. Winn JR, eds. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2006:623-671.
11. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms. In: Mosby, ed. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: 2007: 254-263.
12. Cengiz AT. Stafilokoklar, Ustaçelebi Ş. ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 2003:339-348.
13. Anđ Ö. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. Klimik Derg 1989;2(3):87-90
14. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. The Staphylococci. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, eds. Jawets, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 12th.Ed. New York; 2004:223-30.
15. Ulusoy S. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında *mecA* geninin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metodu ile saptanması (Yüksek Lisans Tezi). Isparta:Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji AD; 2003.
16. Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G, eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005:771-832.
17. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji, Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. ed. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004;9-71.

18. Anthony RM, Connor AM, Power EG, French GL. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(1):30-34.
19. Que A, Philippe M. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2010:2543-2579.
20. Ünal S. *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. ed. *Gram pozitif bakteri enfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004: 23-38.
21. Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of meticillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:113-22.
22. Unat EK. *Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi*. İstanbul: Dergah Tıp Yayınları, 1982: 428-45.
23. Bilgehan H. *Staphylococcus*. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları 2000:240-266.
24. Hajek V, Meugnier H, Bes M, et al. *Staphylococcus saprophyticus* subs. Bovis subs. nov. isolated from bovine nostrils. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:792-796.
25. Bouvet A, Fournier JM, Audurier A, Branger C, Orsoni A, Girerd C. Epidemiological markers for epidemic strain and isolates in an outbreak of nosocomial oxacillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1338-1341.
26. Gerald E Wagner (Çev. Demir Serter) *Stafilokoklar, Streptokoklar ve Diğer Gram-Olumlu koklar*. Serter D, Ertem E, Dereli D, Tünger A, Çev.Ed. 2. Baskı, İzmir: Saray Tıp Kitabevleri, 1992:81-86.

27. Prevost G, Mourey L, Colin DA, Menestrina G. Staphylococcal poreforming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;257:53-83.
28. Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A brief history of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin. www.antimicrobe.org/history/PVL-long.asp
20 Ocak 2013 tarihinde ulaşılmıştır.
29. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2007;87:3-9.
30. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128-1132.
31. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric poreforming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68(5):981-1003.
32. Konig B, Prevost G, Konig W. Composition of staphylococcal bi-componenttoxins determines pathophysiological reactions. *J Med Microbiol* 1997;46:479-485.
33. Prevost G, Cribier B, Couppe P, et al. Panton-Valentine leukocidin and gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995;63:4121-4129.
34. Johnsson D, Mölling P, Stralin K, Söderquist B. Detection of Panton-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LigthCyler PCR: Clinical and epidemiological aspects. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:884-889.

35. Jung N, Lehmann C, Hellmann M, Seifert, Valter MM, Hallek M, et al. Necrotizing pneumonia caused by Panton-Valentine leucocidin- producing *Staphylococcus aureus* originating from a Bartholin's abscess. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008;1-5.
36. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community acquired methicillinresistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton–Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978-984.
37. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):1141-1144.
38. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine Leucocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:2384-2390.
39. Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, et al. Emergence of two populations of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community acquired skin infections. *Br J Dermatol* 2006;154:118-124.
40. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3364-3372.
41. Cercenado E, Cuevas O, Marin M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61:143-149.

42. Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentine lökosidin (PVL) varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2007;41:357-362.
43. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000;13:16-34.
44. Patti JM, Jonsson H, Guss B, et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. J Biol Chem 1992;267(7):4766-4772.
45. Cengiz AS, Us E, Cengiz AT. The Clinical Importance of slime production. İnönü Üniv Tıp Fak Derg 2006;13:193-197.
46. Dündar V, Dündar DE. Stafilokoklar. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. ed. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2002:1507-1516.
47. Brasel JK, Weigelt. AJ. Community associated MRSA as a pathogen. In: Weigelt AJ. ed. MRSA. 2th Ed New York, USA, 2007:46-60.
48. Noble WC. Staphylococcus Disease. In: Collier L, Balchows A, Susman M eds. Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9 th Ed. New York: Oxford University Press 1998:231-294.
49. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002;359(9308):753-759.
50. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002;359:1819-1827.
51. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. Emerg Infect Dis 1997;3:285-293.

52. Hamad AR, Marrack P, Kappler JW. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. J Exp Med 1997;185:1447-1454.
53. Çetinkaya Y, Ünal S. Stafilokokal nazal taşıyıcılık önemi ve tedavisi. Hastane İnfek Derg 1999;3:22-32.
54. Güneş H, Çetin ES. Toplumdan kazanılmış metisiline dirençli *S. aureus*. Acıbadem Üniv Sağ Bil Der 2012;2(3):83-87.
55. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. N Engl J Med 2006;355:666-674.
56. Gorwitz RJ, Jernigan DB, Jernigan JH, and Participants in the CDC-Convened Experts' Meeting on Management of MRSA in the Community. Strategies for clinical management of MRSA in the community: summary of an experts' meeting convened by the Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention, 2006; Atlanta, [http:// www.cdc.gov /ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca.html).10 Ocak 2013 tarihinde ulaşılmıştır.
57. Lundstrom TS, Sobel JD. Vancomycin, trimetoprim-sulfomethoxazole and rifampin. Infect Dis Clin Nort Am 1995;9:747-767.
58. Projan SJ. Antibiotic Resistance in the Staphylococci. Fischetti VA, Novick PR, Feretti J, Portnoy DA. Rood JI, eds. Gram Positive Pathogens. 1st Ed. Washington:American Society for Microbiology 2000:463-470.
59. Ögünç D, Çolak D, Saygan MB ve ark. Kandan izole edilen *S. aureus* suşlarında vankomisin ve teikoplanin etkinliği. Ankem Derg 1999;13(4):479-484.
60. Sünbül M, Eroğlu C, Çınar T, Hökelek M, Leblebicioğlu H. Stafilokok suşlarında vankomisin ve teikoplanin duyarlılığını belirlemede buyyonda mikrodilüsyon ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankem Derg 1998;12:483-487.

61. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Derg 2007;38:127-134.
62. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007;13:222-235.
63. Jolly LS, Wu J, Van Heijenoort J, de Lencastre H, Tomasz A, Mengin-Lecreulx D. The femR315 gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. J Bacteriol 1997;179:5321-5325.
64. Proctor RA, Van Langevelde P, Kristjansson M, et al. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1995;20:95-102.
65. Barrett FF, McGehee RF Jr, Finland M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N Engl J Med 1968;279:441-448.
66. Crossley K, Landesman B, Zaske D. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: II. Epidemiologic studies. J Infect Dis 1979;139:280-287.
67. Rice LB, Sahn D, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, eds. Manual of Clinical Microbiology 8th Ed. Washington DC 2003:1074-1101.
68. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H et al. Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 2002;292:67-74.
69. Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Eagle-Type Methicillin Resistance: new phenotype of high

- methicillin resistance under *mec* regulator gene control. Antimicrobial Agents Chemother 2001; 815–824
70. McDougal L, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol 1986;23:832-839.
71. Lindsay JA, Holden TG. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trend Microbiol 2004;12(8):378-385.
72. Ito T, Katayama K, Asada N, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* intergrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemother 2001;45:1323-1336.
73. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trend Microbiol 2001;9(10):486-493.
74. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46:(1):8-20.
75. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* elements. Antimicrobial Chemother 2009;12:4961-4967.
76. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotid sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrobial Chemother 1999;43:1449-58.
77. Oliveira DC, Milheiriço C, Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* Type VI. Antimicrobial Chemother 2006;10:3457-3459.

78. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Chemother* 2009;53:531-540.
79. Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care associated infection 2001-2003. *Ped Infect Dis J* 2006;25:43-48.
80. Ünal S. Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*: Genetik özellikler. *Ankem Dergisi* 2006;20:100-101.
81. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, et al. Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003;47(11):3574-3579.
82. Ito T, Okuma K, Ma XX, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update* 2003;6:41-52.
83. Martins A, Cunha MRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 2007;51(9):787-795.
84. Kılıç A, Li H, Stratton CW, Tang YW. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types of, as well as Panton- Valentine Leukocidin occurrence among, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J Clin Microbio* 2006;44(12):4436-4440.
85. CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute), M100–S21 (cilt 31 sayı 1) (ISBN: 1-56238-742-1). (ISSN: 0273-3099) , 2011.

86. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY, et al. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30(7):1685-91.
87. Erciş S, Sancak B, Haşçelik G. A comparison of PCR detection of *mecA* with oxacillin disk susceptibility testing in different media and sceptor automated system for both *S.aureus* and coagulase negative Staphylococci isolates. Indian J Med Mic 2008;26(1):21-4.
88. Singh NK, Patel JS, Pandya J, et al. Comparison of Mha and Msa disk diffusion test with *mecA* PCR for detection of methicillin resistant staphylococci isolates from neonatal septicemic patients Asian. Asian J Exp Biol Sci 2010;1(2):250-253.
89. Erciş S, Sancak B, Haşçelik G. Stafilokoklarda metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon yönteminin değeri ve polimeraz zincir reaksiyonu ile karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2003;37:109-115.
90. Akoğlu H. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde 2004-2005 yıllarında hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının moleküler tiplendirmesi (Tıpta uzmanlık tezi). Ankara, Hacettepe Üniversitesi: 2007.
91. Skov R, Smyth R, Larsen R, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and E test on Mueller-Hinton agar. J Clin Microbiyol 2006;44(12):4395-4399.
92. Novales MG, Miranda BL, Perez MV, et al. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5:25
93. Karahan ZC, Dolapçı İ, Tekeli A. *Staphylococcus aureus* izolatlarında Panton-Valentine Lökosidin genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile

amplifikasyon sonuçları üzerine reaksiyon koşullarının etkisi. Mikrobiyol Bul 2009;43:519-528.

94. Pérez JR, Tapia CO, Herazo C, Reyes N. Nasal carriage of Pantone Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. Rev Salud Pública 2011;13(5):824-832.
95. Chongtrakool P, Ito T, Xue Ma X, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob Agent Chemother 2006;3(50):1001-1012.
96. Demir M, Kaleli İ, Cevahir N, Mete E. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg 2003; 17: 56-59.
97. Ergin A, Erciş S, Haşçelik G. Metisiline-dirençli ve -duyarlı *Staphylococcus aureus* kökenlerinde siprofloksasin direnci; klinik ve örneklere göre dağılımı. İnfeks Derg 2005;19:215-218.
98. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Teker A, Özbakkaloğlu B. Metisiline-dirençli ve -duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. İnfeks Derg 2007;21(4):187-191.
99. Güngör S, Uzun KB, Yurtsever SG, Baran N. Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotiklere direnç. Ankem Derg 2012;26(4):171-175.
100. Sung JY, Lee J, Choi EH, Lee HJ. Changes in molecular epidemiology of community associated and health care-associated methicillin-resistant *S. aureus* in Korean children. Diagn Micr Infect Dis 2012;74 28-33.

101. Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 20-23.
102. Özgüneş N, Ergen P, Ceylen N, Yazıcı S, Aksoy Y. Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci ve dirençli suşlarda glikopeptid duyarlılığı. Ankem Derg 2002; 16: 423-426.
103. Altun B, Kocagöz S, Hasçelik G, Uzun Ö, Akova M, Ünal S. Çeşitli hastanelerde izole edilen stafilocok suşlarının fusidik asit ve sık kullanılan diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2003;33:8-11.
104. Diler M, Kocabeyoğlu O, Birinci İ, Erdemoğlu A, Özbek A. Vankomisin ve teikoplaninin metisiline dirençli 252 stafilocok suşuna etkinliğinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. Ankem Derg 1998;12:437-441.
105. Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2005;55:379-382.
106. Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, Bakıcı MZ. Stafilocoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2002;24(4):179-184.
107. Ulusoy S. Toplumdan kazanılmış metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisi. Ankem Derg 2006;20:102-105.
108. Edmond MB, Wallance SE, McClish DK. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals:a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999;29:239-244.

109. Griethuysen A, Pouw M, Leeuwen N, et al. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999;37:2789-2792.
110. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;58:33-39.
111. Makgotlho PE, Kock MM, Hoosen A, et al. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. FEMS Immunol Med Microbiol 2009;57:104-115.
112. Alp E, Klaassen CHW, Doğanay M, et al. MRSA genotypes in Turkey: Persistence over 10 years of a single clone of ST239. J Infect 2009;58:433-438.
113. Akoğlu H, Zarakolu P, Altun B, Ünal S. Hacettepe Üniversitesi erişkin hastanesinde 2004-2005 yıllarında izole edilen hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının epidemiyolojik ve moleküler özellikleri. Mikrobiyol Bul 2010;44:343-355.
114. Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Tsang VY, Lo JY. Pantone–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Hong Kong. J Med Microbiol 2008;57:1440-1443.
115. Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK. Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Two Hospitals in Bangalore, South India. J Clin Microbiol 2005;43:3198-3202.
116. Aires de Sousa M, Crisostomo MI, Sanches IS, et al. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant *S. aureus* from patients in two hospitals in Taiwan and China. J Clin Microbiol 2003;41:159-163.

117. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı İ, Akan ÖA, Karahan ZC. Ankara Üniversitesi hastanesinde 2002-2005 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler özellikleri. Mikrobiyol Bul. 2009;43:1-10
118. Ergon C, Biçmen M, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi. Ankem 2010;24(4):65-70.
119. Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother 2010;16(4):225-254.
120. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008;8:747-763.
121. Kırdar S, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D, Bozdoğan B. Hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşları arasında klonalitenin ve Panton-Valentin lökositidin toksininin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2009;43:529-533.
122. Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of methicillin-resistant *S. aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(3):1083-1085.
123. Chung M, Dickinson G, Lencastre H, Tomasz A. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. J Clin Microbiol 2004;42:542-547.
124. Gonzalez BE, Rueda AM, Shelburne SA, et al. Community-associated strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27(10):1051-1056.

125. Strandén AM, Frei R, Adler H, Flückiger U, Widmer AF. Emergence of SCCmec Type IV as the most common type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital. *Infection* 2009;37:44–48.
126. Moon SY, Lee HJ, Lee MS. Molecular characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates: clonal spread of staphylococcal cassette chromosome mec type IVA between the community and the hospital. *Microbial Drug Resistance* 2010;16(3):217-222.
127. Gülmez D, Sancak B, Erciş S, Karakaya J, Haşçelik G. Toplumdan kazanılmış ve nozokomiyal *Staphylococcus aureus* suşlarında SCCmec tiplerinin ve Panton-Valentine lökositidin varlığının araştırılması: Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile diğer enfeksiyonların karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(3):341-351.
128. Ho PL, Chuang SK, Choi YF, et al. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong. *Diagn Microb Infect Dis* 2008;61:245-250.
129. Del Giudice P, Bes M, Hubiche T, et al. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* strains are associated with follicular skin infections. *Dermatology* 2011;222:167-170.
130. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, et al. Global distribution and evolution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *S. aureus*, 1981-2007. *J Infect Dis* 2010;201(10):1589-97.
131. Aires de Sousa M, Conceicao T, de Lancestre H. Unusually high prevalence of nosocomial Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* isolates in Cape Verde Islands. *J Clin Microbiol* 2006;44: 3790-3793.
132. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratias S, Dimitracopoulus G, Sipiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying

- Panton–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:29-34.
133. Ellington MJ, Hope R, Ganner M, et al. Is Panton-Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK? *J Antimicrob Chemother* 2007;60:402-405.
134. Budimir A, Deurenberg RH, Plecko V, Vink C, Kalenic S, Stobberingh EE. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:331-334.
135. Cirit OS, Yıldırım T, Çoban AY. *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentine Lökosidin (PVL) varlığının araştırılması. *Balkan Med Journal* 2011;2:119-124.
136. Kılıç A, Yılmaz S, Bedir O, Başustaoğlu AC, Güçlü AÜ, Karagöz A. Hastane ve Toplum kaynaklı *Staphylococcus aureus* izolatlarında çeşitli virulans faktörlerinin gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(4):532-545.
137. Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, et al. Healthcare associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 419-422.
138. Tristan A, Bes M, Meugnier H, et al. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2007;13:594-600.