

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA
PANTON VALENTİN LÖKOSİDİN (PVL)
VARLIĞININ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

BAHAR ERYONAR

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA
PANTON VALENTİN LÖKOSİDİN (PVL)
VARLIĞININ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHAR ERYONAR

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.ZEYNEP GÜLAY

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2005.KB.SAĞ.081 sayı ile desteklenmiştir.

İZMİR-2008

“Staphylococcus aureus suşlarında Panton Valentin Lökosidin (PVL) varlığının Polimeraz Zincir Tepkimesi yöntemi ile araştırılması” isimli bu tez 18.11.2008 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mine YÜCESOY

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Özlem YILMAZ

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Nur YAPAR

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	I
ŞEKİL DİZİNİ.....	II
KISALTMALAR.....	III
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe ve sınıflandırma.....	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Üreme Özellikleri, Hücre Duvar Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri.....	4
2.2.1.Üreme ve Tür Özellikleri.....	4
2.2.2. Mikrokapsül Yapısı.....	4
2.2.3. Hücre Duvarı.....	5
2.3. <i>S. aureus</i> 'un Virulans Faktörleri.....	6
2.3.1. Hücre Duvar Elemanları.....	6
2.3.2. Enzimleri.....	8
2.3.2.1. Katalaz.....	8
2.3.2.2. Koagülaz.....	8
2.3.2.3. Fibrinolizin.....	8
2.3.2.4. Hiyaluronidaz.....	9
2.3.2.5. Lipaz.....	9
2.3.2.6. Nükleaz.....	9
2.3.3. Ekzotoksinler.....	9

2.3.3.1. Hemolizinler.....	9
2.3.3.1.1. Alfa hemolizin (Alfa toksin)	10
2.3.3.1.2. Beta hemolizin (Beta toksin)	10
2.3.3.1.3. Gama hemolizin (Gama toksin)	10
2.3.3.1.4. Delta hemolizin (Delta toksin)	10
2.3.3.2. Panton Valentin Lökosidinin (PVL)	10
2.3.3.3. <i>S. aureus</i> 'un epidemiyolojik özellikleri	14
2.3.3.4. Eksfoliatif toksin	15
2.3.3.5. Enterotoksinler	16
2.3.3.6. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)	16
2.4. Virulans Genlerinin Düzenlenmesi	18
2.5. Patogenez ve Yaptığı Hastalıklar	18
2.6. Stafilokokların Laboratuvar Tanısı	20
2.6.1. Gram Boyama ve mikroskopik inceleme	20
2.6.2. Koloni Morfolojisi.....	20
2.6.3. Katalaz Testi.....	20
2.6.4. <i>S. aureus</i> 'u diğer stafilokoklardan ayıran yöntemler	21
2.6.4.1. Lam Koagülaz Testi	21
2.6.4.2. Tüp Koagülaz Testi	21
2.6.4.3. Mannitol Hidrolizi	21
2.6.4.4. Protein A Saptanması	21
2.6.4.5. Hızlı Termonükleaz Testi.....	22
2.7. Stafilokok İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılabilen Antibiyotikler	22

2.7.1. Hücre Duvar Sentez İnhibitörleri	22
2.7.1.1. Beta-laktam Antibiyotikler	22
2.7.1.1.1. Penisilinler	23
2.7.1.1.2. Sefalosporinler	23
2.7.1.1.3. Karbapenemler	23
2.7.1.2. Glikopeptit Antibiyotikler	24
2.7.2. Protein Sentez İnhibitörleri	24
2.7.2.1. Aminoglikozidler	24
2.7.2.2. Makrolidler	24
2.7.2.3. Oksazolidinonlar (Linezoid)	24
2.7.2.4. Streptograminler	25
2.7.2.5. Linkozamidler	25
2.7.2.6. Kloramfenikol	25
2.7.3. Nükleik Asit Sentezi İnhibitörleri	25
2.7.3.1. Sülfonamidler ve Trimetoprim	25
2.7.3.2. Kinolonlar	25
2.7.3.3. Rifampin	26
2.8. Stafilokoklarda metisilin direnci ve epidemiyolojisi	26
2.9. Staphylococcus cassette chromosome <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	27
2.10. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Moleküler Epidemiyolojisi ve Tiplendirme	
Yöntemleri	29
2.10.1. Fenotipik yöntemler	29
2.10.1.1. Antimikrobial Duyarlılık Testleri	30

2.10.1.2. Biotiplendirme.....	30
2.10.1.3. Faj tiplendirme	31
2.10.1.4. Multilokus Enzim Elektroforezi (MLEE)	31
2.10.2. Genotipik yöntemler.....	31
2.10.2.1. Salgın analizleri için kullanılan yöntemler.....	31
2.10.2.1.1. Kromozomal DNA'nın Makrorestriksiyon Analizi ve [(“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE)]	31
2.10.2.1.2. Ribotiplendirme.....	32
2.10.2.1.3. “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) (=Arbitrarily Primed (AP PCR)	33
2.10.2.2. Evrimsel ilişkilerin incelenmesi ve arşivleme İçin Kullanılan Yöntemler.....	33
2.10.2.2.1. <i>coa</i> (Koagülaz) Tiplendirme Yöntemi	33
2.10.2.2.2 “Multi Locus Sequence Typing” (MLST)	34
2.10.2.2.3. <i>spa</i> Tiplendirme.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. İzolatlar.....	36
3.2. Multipleks Polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile <i>pvl</i> Varlığının Araştırılması.....	38
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> Kolonilerinden DNA eldesi.....	38
3.2.1.1. Akromopeptidaz Yöntemi	39
3.2.2. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT Uygulaması	39
3.2.2.1. Multipleks PZT için kullanılan Malzemeler	39
3.2.2.2. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT için kullanılan öncüller	40
3.2.2.3. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması	41
3.2.2.4. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT Thermal Cycler Programı.....	41

3.2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi.....	42
3.3. 16S/mec/nuc Multipleks Polimeraz zincir tepkimesi (PZT)	42
3.3.1. 16S/mec/nuc Multipleks PZT İçin Kullanılan Öncüller.....	42
3.3.2. 16S/mec/nuc Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması	43
3.3.3. 16S/mec/nuc Multipleks PZT Thermal Cycler Programı.....	43
3.3.4 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	44
3.4. Pulsed Field Jel Elektrofrez Uygulaması	44
3.5. Jelin boyanması ve görüntülenmesi	46
3.6. PFGE paternlerinin değerlendirilmesi.....	46
4. BULGULAR	48
4.1. Klinik İzolatların Multipleks PZT (<i>nucA/ pvl</i>) Sonuçları	48
4.2. PVL-pozitif izolatların 16SrRNA/mec/nuc PZR sonuçları.....	51
4.3. PVL-pozitif izolatlara uygulanan PFGE'nin Sonuçları	52
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	61

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Stafilokoklar'da dört serotipin kapsüler polisakkaritlerinin tekrarlayan üniteleri.....	5
Tablo-2: <i>S. aureus</i> 'un adezinleri ve hedefleri	7
Tablo 3: <i>S. aureus</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı.....	36
Tablo 4: Yatan hastalardan ve poliklinik hastalardan gönderilen klinik örneklerin dağılımı	38
Tablo 5: <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT için kullanılan öncüller	41
Tablo 6: Multipleks PZT'de kullanılan öncüller	43
Tablo 7: İzolatların örnek tipleri ile MRSA ve MSSA olanlarının PVL pozitiflik dağılımları.....	49

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Stafilokokların 16S rRNA tabanlı filogenetik ağacı.....	3
Şekil 2: PVL aracılıklı doku nekrozu	12
Şekil 3: PVL'nin neden olduğu , PMN hücrelerindeki apoptoz ve doku nekrozu	13
Şekil 4: Bugün geçerli olan CA-MRSA orijini.....	15
Şekil 5: Süperantijenik uyarım.....	17
Şekil 6: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait multipleks PZT sonuçları örnekler.....	50
Şekil 7: PVL-pozitif izolatların mec-nuc PZT sonuçları	52
Şekil 8: Çalışmamızdaki PVL pozitif saptanan tüm izolatların PFGE görüntüleri	53
Şekil 9: PVL-pozitif <i>Staphylococcus aureus</i> suşları ile Kontrol (EMRSA-2, EMRSA-6, NCTC8325) suşlarının makrorestriksiyon analizi sonucu elde edilen Jakards katsayıları kullanılarak ve Mega Version 3.1 bilgisayar programında UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan dendrogram	54

KISALTMALAR

PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PVL	: Panton-Valentin lökositidin
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
CA-MRSA	: Toplum kökenli metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
HA-MRSA	: Hastane kökenli metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
AP-PCR	: Arbitrarily-primed Polimerase Chain Reaction
VNTR	: Variable Number Tandem Repeats
NAG	: N-asetil glukoz amin
NAM	: N-asetil müramik asit
MSCRAAM	: Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
IgG	: Immunglobulin G
LPXTG	: Leu-Pro-X-Thr-Gly motifi
PNSG	: poli-N-süksinil- β -1,6 glukozamin
tPA	: doku plazminojen aktivatör
TSSI	: Toksik Şok Sendromu Toksini
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
IFN	: İnterferon
BKİ	: Beyin Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri
SCC_{mec}	: Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>

TEŐEKKÖR

Eđitimim ve bu çalıőmam süresince bana her türlü desteği veren danıőmanım Sayın Prof Dr. Zeynep Gülay'a, eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma, desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarıma ve hayatım boyunca daima yanımda olan aileme teőekkür ederim.

ÖZET

***Staphylococcus aureus* Suşlarında Panton Valentin Lökosidinin (PVL) varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması**

Staphylococcus aureus, virulans faktörlerine bağlı olarak insanda deri infeksiyonlarından septisemiye kadar değişen pek çok infeksiyona yol açabilen bir patojendir. *S. aureus*'un virulans faktörlerinden Panton-Valentin lökosidin (PVL), doku nekrozuna yol açan bir sitotoksindir. PVL aynı zamanda son yıllarda çeşitli ülkelerde ortaya çıkan toplum kökenli MRSA (metisiline dirençli *S. aureus*) suşlarının önemli bir virulans faktörüdür. Bu suşlar, sağlıklı çocuklar ve genç erişkinlerde nekroz ile seyreden yumuşak doku ve akciğer infeksiyonları oluşturma özelliğindedir. Bu tip infeksiyonlardaki doku nekrozunun PVL salınımının bir sonucu olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada amacımız farklı şehirlerde (İzmir, Ankara, İstanbul) üretilmiş klinik izolatlarda, *pvl* genine ait 433 bp uzunluktaki, bir bölgeye özgü primerler kullanılarak ilgili genin varlığını araştırmak ve PVL-pozitif bulunan suşların klonal ilişkilerini “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) tekniği ile değerlendirmektir.

Çalışmamızda, *luk*-PV-1 ve *luk*-PV-2 primerleri ile *S. aureus*'a özgü DNAaz genine ait *nuc*-1 ve *nuc*-2 primerleri kullanılarak *nuc* ve *pvl* genlerini eş zamanlı olarak saptayan bir multipleks PZT yöntemi uygulanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 2005-2007 yıllarında klinik örneklerden izole edilen toplam 299 *Staphylococcus aureus* suşu (99 MRSA 200 MSSA) bu yöntemle incelenmiştir. Ayrıca PVL üreten izolatların genellikle kısa süreli klonal ilişkilerin ortaya konmasında “altın standart” olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile klonal ilişkileri araştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 299 izolatın 11'i (1 MRSA, 10 MSSA) (% 3.67) PVL-pozitif olarak saptanmıştır. Metisiline heterorezistan izolatların rutin duyarlılık testlerinde saptanmalarında güçlük olabildiği için PVL-pozitif izolatların tümüne aynı zamanda 16S/*mec*/*nuc* multipleks PZT uygulanmış ve metisilin direnci değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nden MSSA olarak gönderilmiş bir izolatın *mec* geni taşıdığı yani MRSA olduğu saptanmıştır. MRSA izolatları arasındaki oran % 1 (1/99), MSSA izolatları arasındaki oran % 5 (10/200)'tir. PVL-pozitif tek MRSA izolatı Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden gelen bir kan örneğinden üretilmiştir. PVL-pozitif MSSA izolatlarının merkezle göre dağılımı; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi'nden 6 izolat, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nden 3 izolat, İstanbul

Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 1 izolat şeklindedir. Gönderilen MSSA suş sayısına göre oranlar; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde % 10 (6/59), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nde MSSA için % 4.8 (3/62) ve MRSA için % 2.6 (1/38), İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde % 1.25 (1/79) olarak belirtilmiştir.

PVL-pozitif izolatların % 18'i (2/11) kandan (1 MSSA, 1MRSA), % 82'si (9/11) yara kültürlerinden izole edilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi PVL-pozitif izolatlarının kliniklere göre dağılımı % 50 (3/6)'si Kadın Hastalıkları ve Doğum, % 16.6 (1/6)'sı Kulak Burun Boğaz, % 16.6 (1/6)'sı Beyin Cerrahisi ve % 16.6 (1/6)'sı Plastik Cerrahi servislerindedir.

PVL-pozitif izolatların PFGE ile klonal ilişkileri incelenmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi izolatlarının dördü birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri ikili gruplar halinde birbirleri ile identiktir. Her iki grup arasında da bir bant fark bulunmaktadır. İdentik izolatlardan ikisi iki aylık bir süre içerisinde farklı servislerden izole edilmiştir. Hacettepe Üniversitesi izolatlarından birinin makrorestriksiyon paterni de bu gruplar ile benzerdir. Diğer izolatlar tamamen farklı suşlar olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak; özellikle toplum kökenli metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) suşlarının bir göstergesi olan Panton-Valentin lökosidin (PVL)'in, farklı merkezlerden toplanan MSSA ve MRSA izolatlarındaki oranları sırasıyla % 1.3-10 ve % 0-2 olarak bulunmuştur. Bu oranlar yüksek olmamakla birlikte; klonal olarak birbirleriyle ilişkili izolatların saptanması PVL-pozitif suşların yayılma potansiyelinin bir göstergesi olabilir. Metisilin direncinin rutin yöntemlerle gösterilmesi zor olabileceği için PVL-pozitif izolatlarda *mecA* genine yönelik moleküler yöntemlerin uygulanması toplum kökenli MRSA suşlarının tanımlanmasında yardımcı olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Panton-Valentin Lökositin (PVL), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

SUMMARY

Investigation of the presence of panton-valentin leucocidin (PVL) with PCR in *Staphylococcus aureus* isolates

Staphylococcus aureus, is a pathogen causing many infections varying from skin infections depending on virulence factors to septicaemia. Panton-Valentine Leukocidin (PVL), one of the virulence factors of *S. aureus*, is a cytotoxin which causes tissue necrosis. Also, PVL is one of the important virulence factors of community acquired MRSA (methicillin resistant *S. aureus*) strains which appeared recently in several countries. These strains have the feature of forming soft tissue and lung infections accompanying with necrosis in healthy children and young adults. The tissue necrosis in these types of infections is reported as a consequence of PVL release. Our consumption/aim in this study is to investigate the presence of the related gene by using 433 bp long, *pvl* belonging primers which were obtained in clinical isolates in different countries (Ankara, İstanbul, İzmir) and to evaluate the clonal correlation/relation between the obtained PVL-positive strains with “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) technique.

In our study, a multiplex PCR method was applied, which simultaneously determines *nuc* and *plv* genes by using *luk-PV-1* and *luk-PV-2* primers and *S. aureus* specific DNAase originated *nuc-1* and *nuc-2* primers. In total, 299 clinical samples which were collected from Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital, Hacettepe University Medical Faculty Child Hospital and İstanbul University Çapa Medical University Medical Faculty in 2005-2007 was examined with this method. Also to reveal the short term clonal correlation of PVL producing isolates, the clonal correlation were investigated with PFGE which is accepted as “the gold standard”.

The 11 of the 299 isolates (1 MRSA, 10 MSSA) (3.67 %) included in the study were determined as PVL-positive. As there was a difficulty in detecting of the routine sensibility of methisiline heteroresistant isolates, 16S/*mec/nuc* multipleks PCR was applied totally to the PVL-positive isolates at the same time with methisiline resistance investigation.

Consequently, it was detected that the isolate supposed to be MSSA from Hacettepe University Medical Faculty Child Hospital was in fact a MRSA isolate which is carrying *mec* gene. The rate between the MRSA isolates were detected as 1 % (1/99) and the rate between MSSA isolates were determined as 5 % (10/200). The only PVL-positive MRSA isolate was isolated from a blood sample obtained from Hacettepe University Medical Faculty Child Hospital. According to the centers, the distribution of PVL-positive MSSA isolates were as

follows; 6 isolates from Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital, 3 isolates from Hacettepe University Medical Faculty Child Hospital and 1 isolate from Istanbul University Çapa Medical University Medical Faculty. The rates according to the number of obtained MSSA strains were determined as 10 % (6/59) in Dokuz Eylül University Medical Faculty Hospital, 4.83 % (3/62) for MSSA and 2.6 % (1/38) for MRSA in Hacettepe University Medical Faculty Child Hospital and 1.25 % (1/79) in İstanbul University Çapa Medical University Medical Faculty.

18 % (2/11) of PVL-positive MSSA isolates were isolated from blood (1 MSSA, 1MRSA) and 82 % (9/11) were isolated from wound cultures. The distribution of the rates of PVL-positive isolates/clinics for Dokuz Eylül University were; 50 % (3/6) in Gynaecologics and Obstetrics, 16.6 % (1/6) in Otorhinolaryngology, 16.6 % (1/6) in Brain Surgery and 16.6 % (1/6) Plastic Surgery services.

The clonal relation between PVL-positive isolates was investigated with PFGE. It was reported that there was correlation between the four isolates obtained from Dokuz Eylül University. The macrorestriction patterns of these isolates were identical with each other in double groups. Between these two groups a single band pattern difference was found. The two of identic isolates were isolated from different services in two months period. One of the isolates obtained from Hacettepe University have similar macrorestriction pattern with these two groups. Other isolates were evaluated as completely different strains.

As a result; the Panton-Valentine Leukocidin's (PVL) was an indicator of especially community acquired methisiline resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) strains and MSSA and MRSA isolate rates collected from different centers were found respectively 1.25-10 % and 1.25 % Besides these rates were not high; the detection of clonal correlation between isolates may indicate the potential of PVL-positive strains extension. As detecting the the methisiline resistance with routine methods might be difficult, applying molecular methods specific to *mecA* gene in PVL-positive isolates would be helpful for the characterization of the community acquired MRSA strains.

Key words: Panton-Valentin Leucocidin (PVL), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA), multiplex PCR, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus insanda ciddi infeksiyonlara neden olan bir bakteri türüdür. Birçok farklı virulans faktörüne bağlı olarak veya doğrudan invazif etki ile, yumuşak doku infeksiyonlarından pnömoni, bakteriyemi ve toksik şok sendromuna kadar değişen klinik tablolara yol açabilmektedir. Bu patojenin tedavide kullanılan antibiyotiklere hızla direnç kazanması, infeksiyonlardaki mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır. *S. aureus* izolatlarındaki en önemli direnç özelliği metisilin direncidir. Metisiline dirençli suşlar duyarlı suşlardaki penisilin bağlayan proteinler (PBP) yerine yeni ve düşük afiniteli bir (PBP 2a) ürettikleri için tüm beta-laktam ajanlara dirençlidir (1). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) infeksiyonları 1961'de İngiltere'deki ilk tanımlanmasından bu yana, tüm dünyada, özellikle hastanelerde önemli bir problem haline gelmiştir (2).

S. aureus'un virulans faktörlerinden biri olan PVL, lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna yol açan bir sitotoksindir. PVL, *lukS-PV* ve *lukF-PV* diye isimlendirilmiş iki adet beraber transkribe edilen gen tarafından kodlanmaktadır (3). Bu genler *S. aureus* kromozomuna integre olmuş bir profaj kromozomu (ϕ Sa2) ile taşınır (4). *pvl* geni içeren izolatlar, PVL'ye özgü sınıf S (slow:yavaş) ve sınıf F (fast:hızlı) proteinlerini üretirler (3). PVL ile birlikte diğer stafilokok süperantijenlerinin de bulunması ciddi doku nekrozları ile sonuçlanabilmektedir (2).

PVL, aynı zamanda son yıllarda çeşitli ülkelerde ortaya çıkan toplum kökenli metisiline dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) suşlarının önemli bir virulans faktörüdür. Bu suşlar, daha önce bilinen risk faktörleri ve hastanede yatış öyküsü bulunmayan sağlıklı çocuklar ve genç erişkinlerde nekroz ile seyreden yumuşak doku ve akciğer infeksiyonları oluşturma özelliğindedir. Bu tip infeksiyonlardaki doku nekrozunun PVL salınımının bir sonucu olduğu bildirilmektedir (2). CA-MRSA infeksiyonları sağlıklı bireylerde meydana gelmesine karşın morbidite ve mortalitesi ağırdır. PVL-pozitif CA-MRSA salgınları hapisaneler, ordu ve homoseksüel topluluklar gibi kapalı yaşayan topluluklarda ve aynı zamanda sporcular, sağlık personeli ve ailelerinde bildirilmiştir (3).

PVL, *S. aureus* suşlarının % 5'inden daha azı tarafından üretilmektedir. Lina ve arkadaşlarının 171 *S. aureus* suşu ile yaptığı bir çalışmaya göre; fronkül ile ilgili suşların %93'ünde, hemorajik pnömoniden üretilenlerin %85'inde, selulit suşlarının %55'inde, kutanöz

apselerin % 50'sinde, osteomyelit suşlarının % 23'ünde, tırnak yatağı infeksiyonlarının % 13'ünde *pvl* geni saptamıştır (5). Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu konudaki ilk çalışma, 2005-2006 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarı'nda izole edilmiş 55 MRSA ve 79 MSSA suşunun yer aldığı çalışmadır. Bu çalışmada PVL pozitifliği oranı % 10.3 olarak saptanmıştır ve PVL-pozitif olarak saptanan izolatların tümü MSSA suşlarıdır (6). İstanbul'da yapılan yakın tarihli başka bir çalışmada ise, 2007-2008 yılları arasında üretilmiş, seçilme kriterleri belirtilmemiş MRSA izolatlarında PVL pozitiflik oranı %41, MSSA izolatlarında ise %24 olarak belirtilmiştir (7). Sonuç olarak ülkemizde yapılan çalışmaların sayısı kısıtlıdır ve sadece belirli üniversite hastanelerine başvuran hastaların izolatlarını içermektedir. Dünya literatürüne bakıldığında da, sadece MSSA izolatlarında veya tam tersine MRSA izolatlarının daha yüksek oranda toksin ürettiğini bildiren farklı çalışmalar bulunmaktadır (8,6,9). Dolayısıyla sonuçlar coğrafi bölgeye ve o bölgede hakim olan *S. aureus* klonuna göre değişmektedir (6,10,11).

Staphylococcus aureus ve özellikle MRSA izolatlarının moleküler tiplendirmesinde farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunlar arasında makrorestriksiyon analizi ve “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE), “arbitrarily-primed PCR” (AP-PCR) ve dizi analizi tabanlı teknikler örneğin; [“multilocus sequence typing” (MLST); *spa* ve *coa*, “Variable Number Tandem Repeats” (VNTR)] sayılabilir. Bu tekniklerden PFGE bir çok çalışmada izolatlar arasındaki klonal ilişkinin incelenmesinde “altın standart” yöntem olarak kullanılmıştır (12,13).

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında;

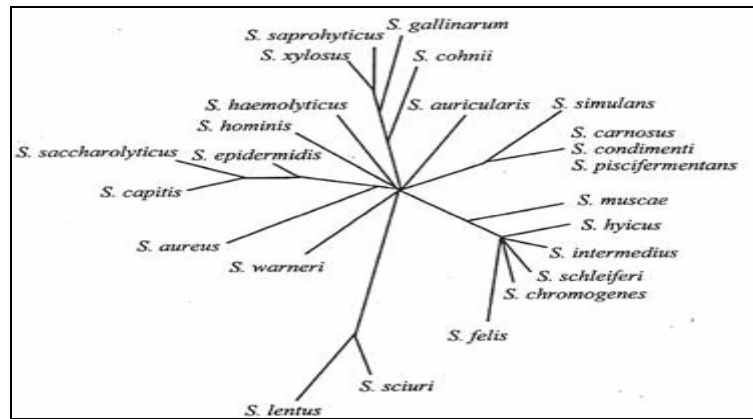
- 1) Ülkemizde farklı şehirlerde (İzmir, İstanbul, Ankara) izole edilen MRSA ve MSSA izolatlarında *pvl* varlığının araştırılması,
- 2) PVL-pozitif izolatların klonal ilişkilerinin PFGE tekniği ile saptanması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve sınıflandırma

Stafilokoklar ilk kez 1878’de Robert Koch tarafından tanımlanmış, 1880’de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881’de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston stafilokokların fare ve kobaylar için patojen olduğunu saptamıştır. *Staphylococcus* terimi Grekçe staphyle (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexander Ogston tarafından seçilmiştir (14). Rosenbach 1884’te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir (15).

Günümüze değin *Micrococcaceae* ailesi içinde yer alan *Staphylococcus* genusuna ait 35 tür saptanmıştır. Bu türlerin 17’si insan klinik örneklerinden üretilmiştir. Laboratuvarda diğer stafilokok türlerinden koagülaz üretme özelliği ile ayrılan *Staphylococcus aureus*, en patojen stafilokok türüdür. *Staphylococcus* genusu içinde yer alan ve fırsatçı infeksiyon etmeni olarak karşımıza çıkabilen diğer türler; *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus caprae*’dir (14,16). Şekil 1’de stafilokok türlerinin 16S rRNA dizilerine göre elde edilmiş filogenetik ağacı görülmektedir (17)



Şekil 1: Stafilokokların 16S rRNA tabanlı filogenetik ağacı (kaynak no17)

2.2. *Staphylococcus aureus*'un Üreme Özellikleri, Hücre Duvar Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri

2.2.1. Üreme ve Tür Özellikleri

S. aureus, mikroskopik olarak 0.5-1.7 µm çapında, Gram pozitif kok şeklinde görülen bir bakteri türüdür. Koklar tek tek, çiftler veya tetratlar veya kısa zincirler halinde bulunabilir (17). Birden fazla düzlemde bölündüğü ve birbirinden ayrılmadığından tipik üzüm salkımı görünümüne düzensiz kümeler oluşturur (15).

Hareketsiz olan *S. aureus*, fakültatif anaeroptur. 18-45 °C'de üreyebilen bu bakterinin optimal üreme ısısı 37 °C ve optimal üreme pH'sı 7.4'tür (16,18,19).

Makroskopik olarak *S. aureus*, hem kanlı hem de seçici olmayan diğer katı besiyerlerinde hızlı üremesiyle karakterizedir (14). *S. aureus* izolatları %7.5-10 NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilir (11). Katalaz pozitifdir (16,18). Oluşturduğu koloniler düzgün, opak, konveks ve 24 saatlik inkübasyonda 1-3 mm çapındadır. *S. aureus* izolatlarının çoğu hücre zarındaki karotenoid yapı pigmentleri nedeni ile altın sarısı renginde koloni oluştururlar. Anaerobik şartlarda ve sıvı besiyerinde üreme, pigment oluşumunu azaltan faktörlerdir (16,18). Birçok izolat at, koyun ya da insan kanlı besiyerlerinde beta hemoliz yapar (14).

S. aureus, glukoz ve mannitol başta olmak üzere birçok karbonhidrattan asit oluşturur (16,19).

2.2.2. Mikro kapsül Yapısı

Klinik *S. aureus* izolatları polisakkarit yapısında bir mikro kapsül oluşturmaktadır. İmmunotiplendirme sonucunda 11 farklı kapsül tipi tanımlanmıştır. Önemli klinik izolatların % 70-80'i kapsüller serotip 5 ve 8 içermektedir. Bu iki kapsül tipi, özellikle de tip 8, *S. aureus*'un diğer virulans faktörleri ile de bağlantılıdır. Örneğin, Toksik Şok Sendrom Toksini üreten *S. aureus*'ların kapsülü tip 8'dir (16,20,21). Tip 5 ve tip 8 kapsüller serotipin tekrarlayan trisakkarit kısımları benzerdir ve aynı şeker kompozisyonuna sahiptirler. Sadece O-asetilasyon pozisyonu ve amino şekerlerinin arasındaki bağlar farklıdır. Tip 1, 2, 5 ve 8 serotiplerinin tekrarlayan üniteleri Tablo 1'de gösterilmiştir (22).

Tablo 1: Stafilokoklar'da dört serotipin kapsüler polisakkaritlerinin tekrarlayan üniteleri

Serotip	Tekrarlayan Üniteler
Tip 1	→4)-α-D-GalNAcAp(1→4)-α-D-GalNAcAp(1→3)- α -D-FucNAcp(1→
Tip 2	→4)-β-D-GlcNAcAp(1→4)- β-D-GlcN(N-asetialanil)AcAp-(1→
Tip 5	→4)-3-O-Ac -β-D-ManNAcAp(1→4)- α-L-FucNAcp(1→3)- β-D-FucNAcp(1→
Tip 8	→3)-4-O-Ac- β-D-ManNAcAp(1 →3)- α -L-FucNAcp(1→3)- β-D-FucNAcp(1-

2.2.3. Hücre Duvarı

Stafilokok hücre duvarı kuru ağırlığının %50'sini, birbiriyle bağlantılı yaklaşık 40 katmandan oluşan peptidoglikan yapısı oluşturur (15,23). Peptidoglikanda β(1,4) bağları ile birbirine bağlı N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) üniteleri glikan omurgayı oluşturur. L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin ve D-alanil D-alanin aminoasitleri NAM'a bağlı peptid zincirini meydana getirir. Stafilokok hücre duvarında bir penta (tetra) peptid zincirde dördüncü pozisyonda bulunan D-alaninin karboksi terminali ile, bir diğer pentapeptiddeki L-lizinin amin grubu pentaglisin köprüleri aracılığı ile çapraz bağlanır. Çapraz bağların sayısı, suşun özelliklerine göre değişebilir. Örneğin, MRSA izolatlarındaki çapraz bağ sayısı, MSSA izolatlarına kıyasla azdır (15,23).

Peptidoglikan tabakanın dışında teikoik asit ve yüzey proteinleri yer almaktadır. Teikoik asit, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan şeker- alkol- fosfat polimerleridir. Hücre yüzeyinde bulunan teikoik asit bakteriye antijenik özellik kazandırmaktadır. Stafilokoklarda ribitol teikoik asit bulunmaktadır. Ribitol teikoik asit, peptidoglikandaki NAM'a bağlıdır. Teikoik asitin fibronektine bağlanma özelliği nedeniyle stafilokoklar mukozal yüzeylere tutunabilme yeteneğindedirler (15,24).

Virulans açısından önemli bir yapı olan protein A, *S. aureus* hücre duvar peptidoglikanına kovalan olarak bağlıdır. Bu, IgG moleküllerinin Fc bölgesine bağlanabilen özel bir proteindir (16). Molekül ağırlığı 13.000 Dalton'dur. Stafilokoklarda; ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve

hücre dışı olmak üzere üç tip protein A bulunmaktadır. Protein A, komplemanı aktive eder, antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkileri de bulunmaktadır (15).

2.3. *S. aureus*'un Virulans Faktörleri

S. aureus suşlarının çeşitli virulans faktörleri bulunmaktadır. Bu virulans faktörlerini; hücre duvar elemanları, enzimler ve ekzotoksinler olarak üç grupta incelemek mümkündür.

2.3.1. Hücre Duvar Elemanları

S. aureus'un bazı virulans faktörleri protein yapıdadır ve hücre duvarında peptidoglikana bağlı olarak bulunurlar. Bu proteinler bakterinin, IgG ve fibrinojen gibi kan proteinlerine veya fibronektin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanmasına aracılık eder. Bu tip hücre dışı matriks proteinlerine bağlanan yüzey adezinlerine, Adezif Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Elemanları ("Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules"; MSCRAMM) denmektedir. *S. aureus*'un yapışkan yüzey proteinleri için iki olası rol düşünülmüştür. Bunlardan ilki bakterinin kan veya doku komponentleri ile kaplanarak bağışıklık sisteminden korunmasını sağlamak, ikincisi ise dokuya bağlanmasını kolaylaştırmaktır (25). Yüzey adezinleri *S. aureus*'un plastik yüzeylere tutunmasından da sorumludur. Vücutta bulunan plastik cihazlar ve kateterler, fibronektin, kollajen ve fibrinojen gibi doku proteinleri ve kan tabakası ile hızla kaplanıp *S. aureus* biyofilmi için ilk tabakayı oluşturur. MSCRAMM hücre içinde sentezlendikten sonra, sitoplazmik membran dışına salgılanır. Bu moleküllerin birçoğu sortaz olarak adlandırılan bir enzim tarafından peptidoglikandaki pentaglisin köprülerine kovalent olarak bağlanır. MSCRAMM ve sortaz *S. aureus*'a özgü değildir. Gram pozitif bakterilerin birçoğunda bulunmaktadır. Adezin özelliğindeki proteinin salgılanması ve peptidoglikana bağlanması sırasında sortaz, salgılanmış proteindeki Leu- Pro- X- Thr- Gly (LPXTG) motifini tanıır. Adezin proteininin N-terminal ucundaki sinyal dizisi proteini salgınım sürecine yönlendirir. Salgınım sırasında sinyal dizisi, sinyal peptidaz tarafından uzaklaştırılır. Bu sırada salgılanmış protein, C-terminal ucu ile halen hücreye bağlı durumdadır. Sortaz enzimi ile işlem gören proteinler yukarıda da belirtildiği gibi LPXTG amino asit motifi taşırlar. Bu dizi, proteinin hücreye bağlandığı membrandan geçen bölümü ile peptidoglikan boyunca uzanan bölgesi arasında yer alır. Sortaz, LPXTG segmentini threonin ve glisinin arasından keser. Kesilen proteinin N-terminal ucunu henüz çapraz bağlantı oluşturmamış bir pentaglisin köprüsüne bağlar.

Böylelikle sortaz ile işlenen proteinler peptidoglikana bağlanarak hücre yüzeyinde yer alırlar (25).

S. aureus yüzey adezinlerinin tamamı protein değildir. Örneğin, poli-N-süksinil- β -1,6 glukozamin (PNSG) polisakkarit yapıda bir yüzey adezinidir. *S. aureus*'un yabancı yüzeylerde biyofilm oluşturması ile ilgili olan bu polisakkariti sentezleyen enzimleri kodlayan genler ica olarak adlandırılır. PNSG, *S.epidermidis* suşları tarafından da yapılmaktadır. *S. aureus*'un adezinleri ve hedefleri Tablo 2'de gösterilmiştir (25).

Tablo 2: *S. aureus*'un adezinleri ve hedefleri

Adezinler	Hedef
Fibronektin bağlayan protein (FnBP)	Fibronektin
Protein A	IgG'nin Fc bölgesi
PNSG	Plastik
Kollajen bağlayan protein	Kollajen
Koagülaz	Protrombin
'Clumping' faktör (Bağlı Koagülaz)	Fibrinojen

Yüzey adezinlerinin hem bakteri yüzeyinde bulunmaları hem de virulanstaki rolleri nedeniyle bağışıklık sistemi için iyi birer hedef oluşturdukları düşünülebilir. Ancak fibronektin bağlayan proteinlere karşı oluşturulan antikorların özelliği nedeniyle insan ve hayvanlar *S. aureus* yüzey proteinlerine karşı antikor oluştursalar bile infeksiyonlarına karşı bağışıklık göstermezler. Bu antikorlar stafilokokkal protein FnBP'nin fibronektine bağlanmasını engellemez. Bunun nedeninin antikorların fibronektine bağlanmış FnBP'ye özgül olması olduğu gösterilmiştir (25). Bir başka yüzeyle ilişkili virulans faktörü olan Protein A ise, IgG yapısındaki antikorların Fc kısmına bağlanır. Bu yüzden antikor bağlanması bakteriyi opsonize etmez ve bakterinin bağışık yanıtı kaçışını sağlar (25).

Kemotaksis ve fagositozu önleyip, yabancı cisimlere adheransı sağlayan kapsül yapısı; organizmanın şeklini verip dayanıklılığını sağlayan, konakta endojen pirojenlerin yapımını stimüle edip, lökosit kemotaksisine ve abse oluşumuna neden olan peptidoglikan; immunkomplekslerin oluşumuna ve komplemanın aktivasyonuna neden olan protein A; fibronektine bağlanma özelliği nedeniyle mukozal yüzeylere tutunmaya aracılık eden teikoik asit; kolonizasyonu sağlayan yüzey proteinleri, *S. aureus*'un virulansını arttıran yapısal özelliklerdir (16,20).

2.3.2. Enzimleri

S. aureus, virulansına katkıda bulunan çeşitli enzimler üretmektedir.

2.3.2.1. Katalaz

Katalaz enzimi tüm stafilokok suşları tarafından üretilmektedir. Bu enzim, mikroorganizmanın fagositozunun ardından fagositik hücreler içinde, miyeloperoksidaz sistemi tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti inaktive etmekte rol alır. Hidrojen peroksit, katalazın etkisiyle oksijen ve suya parçalanır (14,16)

2.3.2.2. Koagülaz

S. aureus'ta bağlı ve serbest koagülaz olmak üzere iki ayrı koagülaz bulunmaktadır. Serbest koagülaz protein yapıdadır. Plazmadaki 'coagulase reacting factor' (CRF) yi aktive etmekte, bu faktör de fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlamaktadır. Bağlı koagülaz ise, 'clumping factor' olarak da adlandırılmaktadır. Bağlı koagülaz plazmadaki fibrinojene direkt olarak bağlanır. Bunun sonucunda, bu faktörün araştırılması amacıyla yapılan lam koagülaz testinde, stafilokoklar serum ile karıştırıldığında kümeleşme görülmektedir (16).

Hem serbest hem de bağlı koagülaz proteinleri, bakterinin fibrin ile kaplanmasını ve bu şekilde opsonizasyondan ve fagositozdan korunmasını sağlar (16).

2.3.2.3. Fibrinolizin

Stafilokinaz olarak da adlandırılan fibrinolizin, fibrin pıhtılarını bozup, enfeksiyonun komşu dokulara yayılmasına olanak sağlamaktadır (15). *S. aureus* izolatlarının hemen hemen hepsi tarafından yapılmaktadır. Normalde pıhtının erimesi sırasında endotelial hücreler, doku

plazminojen aktivator (tPA) adlı bir protein salgırlarlar. tPA plazminojenle etkileşime girer, fibrin ağını parçalayan plazmin adlı yapı oluşur ve pıhtı bozulur. Bu işlem sürekli kontrol altındadır. Serbest plazmin kanda hızla parçalanır. Fibrinolizin de plazminojeni aktive eder fakat bu yol kontrol edilmez. Fibrinolizin aktivitesi sadece pıhtıyı tahrip etmez, aynı zamanda hücrelerle birlikte yapılan fibrin iplikçiklerini ve ekstrasellüler matriksi de tahrip eder böylece bakteri doku boyunca hareket eder.

Ekstrasellüler matriks, protein ve polisakkaritlerden oluşmuştur. *S. aureus*, fibrinolizin ile birlikte proteazları ve hiyaluronidazın etkisiyle ekstrasellüler matriksin bölgesel bozulmasına neden olabilir (16).

2.3.2.4. Hiyaluronidaz

S. aureus suşlarının % 90'ından fazlası hiyaluronidaz oluşturur. Hiyaluronidaz hiyalüronik asitleri hidrolize eder. Bu enzim dokuda mukopolisakkaritlerce oluşturulan hücreler arası matriksi parçalayarak, organizmanın doku içinde yayılımını dolayısıyla infeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır (14,15,16).

2.3.2.5. Lipaz

Bütün *S. aureus* izolatları lipaz oluşturur. Lipaz, lipidleri hidrolize eder ve bu şekilde stafilokokların deri ve deri altı bölgelere yayılımını sağlar. Ayrıca yüzeysel doku infeksiyonlarından da sorumludur (15).

2.3.2.6. Nükleaz

Nükleaz tüm *S. aureus* suşları tarafından salgılanmaktadır. Nükleik asitleri parçalayarak *S. aureus*'un invazyon yeteneğini artırır (16).

2.3.3. Ekzotoksinler

S. aureus, konak hücrenin fonksiyonunu veya morfolojisini etkilemesi nedeniyle "toksinler" olarak tanımlanan çeşitli hücre dışı ürünler üretmektedir (14).

2.3.3.1. Hemolizinler

S. aureus'un dört değişik hemolizini tanımlanmıştır.

2.3.3.1.1. Alfa hemolizin (Alfa toksin)

İlk kez 1900 yılında Kraus ve Clairmant tarafından tanımlanmıştır. Alfa toksin, *S. aureus*'un temel hemolizini olup, *S. aureus* kültürlerinde oluşan beta hemolizin nedenidir. İnsan trombosit ve makrofajları ile doku kültürleri hücrelerinde sitolitik etkiye sahiptir. Monositler ise bu toksine dirençlidir (11). Alfa toksin deride nekroza neden olur. Antijeniktir (16,26). Alfa toksin, bakterilerin nötrofillerden kaçışında rol oynar. Ayrıca sitokin üretimini başlatan hücrel zarara neden olarak şoka katkı sağlar (27).

2.3.3.1.2. Beta hemolizin (Beta toksin)

1935 yılında Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır. Stafilokokkal sfingomiyelinazdır. Sfingomiyelin üzerine etki ederek eritrositleri hemolizine neden olmaktadır. Antijeniktir (15,16,26).

2.3.3.1.3. Gama hemolizin (Gama toksin)

1938 yılında Smith ve Price tarafından tanımlanmış, Mölby Wadström tarafından elde edilmiştir. İnsan, koyun, tavşan eritrositlerin bu toksine duyarlı, at ve kuş eritrositleri ise dirençlidir (16,28).

2.3.3.1.4. Delta hemolizin (Delta toksin)

1947 yılında Williams ve Harper tarafından bildirilmiştir. Antijenik değildir. Eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerinde litik etkisi bulunan bir proteindir (16,28).

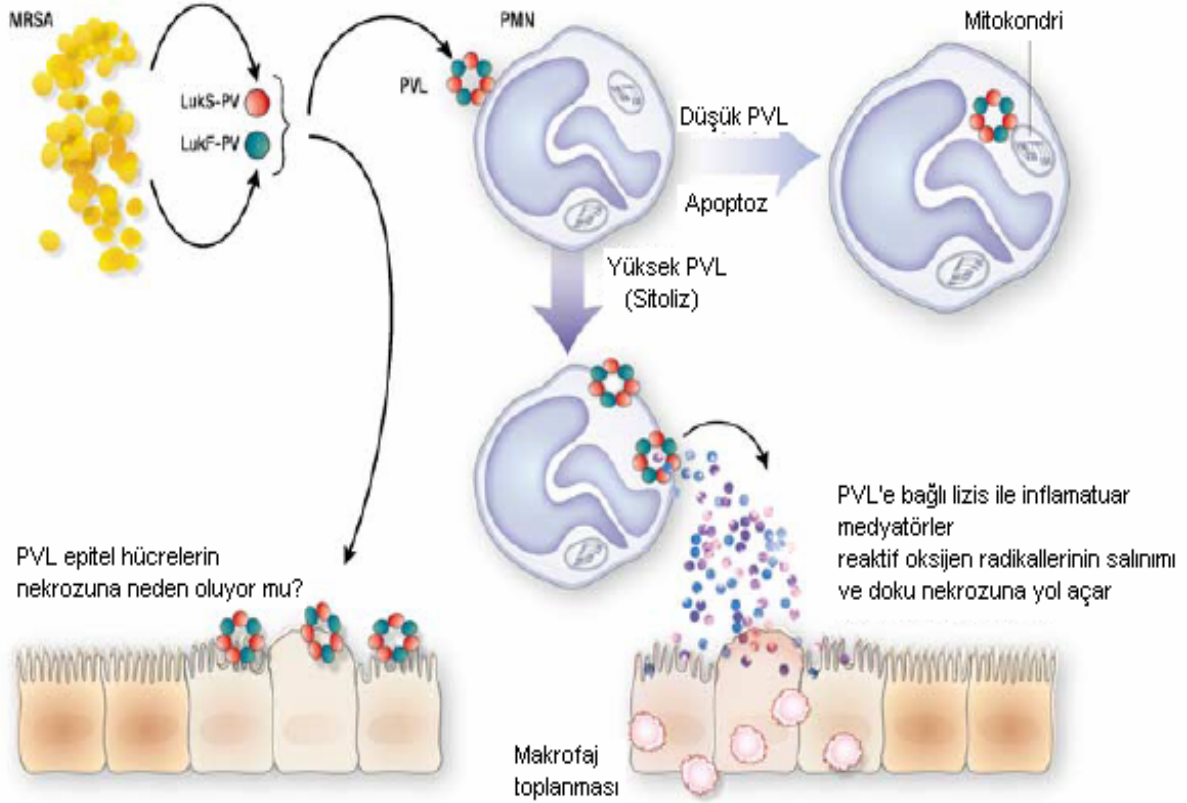
S. aureus suşlarında alfa ve delta toksin predominant olarak bulunmaktadır.

2.3.3.2. Panton Valentin Lökosidinin (PVL)

Panton Valentin Lökosidin (PVL), lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna neden olan *S. aureus*'a ait bir sitotoksindir (3). PVL ilk defa 1894'te Van deVelde tarafından 'substance leukocidine' (lökositleri öldüren madde) olarak tanımlanmıştır. Panton ve Valentine adlı araştırmacılar ise bu lökotoksinin deri ve yumuşak doku infeksiyonları ile ilişkili olduğunu 1932'de açıklamışlardır (8). Sonrasında *pvl* geninin tanımlanmasıyla beraber toplum kökenli MRSA (community acquired MRSA; CA-MRSA) izolatlarının şiddetli deri ve yumuşak doku

infeksiyonları ve nekrotizan pnömoninin PVL ile ilişkili olduğu görüşü iyice kuvvetlenmiştir (8). Klinik bulgular da PVL-pozitif *S. aureus* infeksiyonlarının PVL-negatif *S. aureus* infeksiyonlarından daha şiddetli olduğunu göstermektedir. Örneğin PVL-pozitif *S. aureus* ile ilişkili pnömoni daha sıklıkla sepsis, yüksek ateş, lökopeni, hemoptizis, plevral efüzyon ve ölüm ile seyreder (8). PVL-pozitif *S. aureus* 'un neden olduğu nekrotizan pnömonilerin özellikle genç ve sağlıklı bireylerde şiddetli seyrettiği çoğunlukla da ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir (29). Toplum kökenli pnömoni ile PVL üreten *S. aureus* suşları arasındaki ilişkiyi ilk olarak 1999 yılında Lina ve arkadaşları ortaya koymuşlardır (5). Gillet ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarına göre PVL-pozitif *S. aureus* 'un neden olduğu nekrotizan pnömonilerdeki ölüm oranı yoğun tedaviye rağmen %75 olarak bildirilmiştir (30).

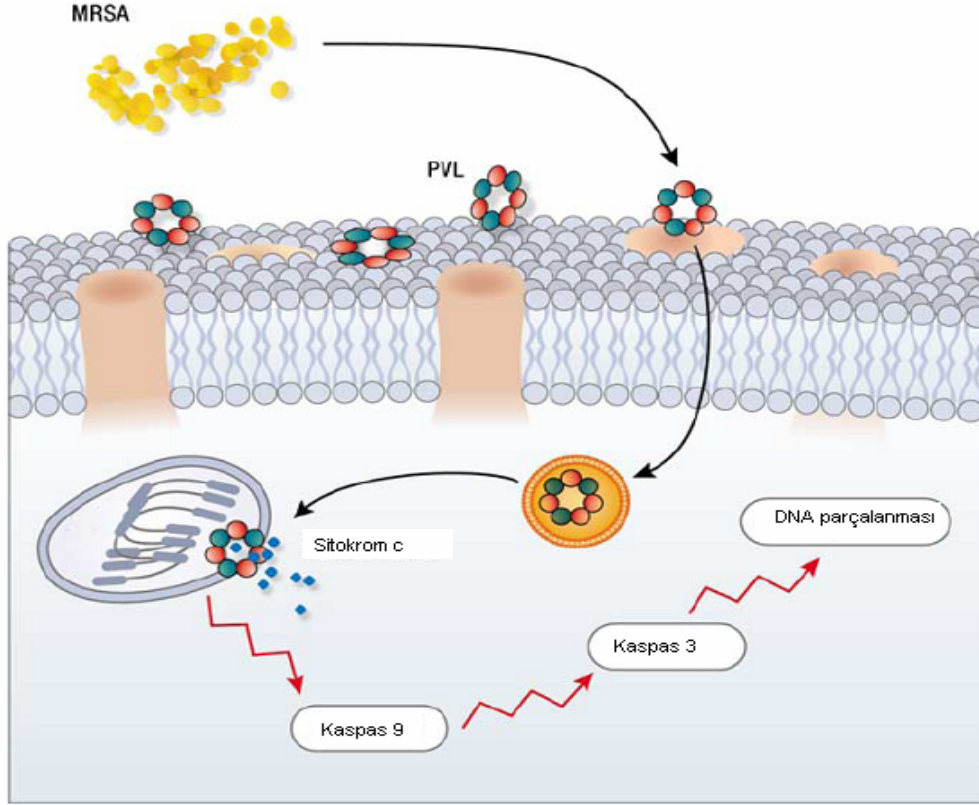
PVL, lukS-PV ve lukF-PV diye isimlendirilen, beraber transkribe edilen ve Φ Sa2 fajı ile taşınan iki gen tarafından kodlanmaktadır (3,31). Birbirleriyle sinerjik olarak çalışarak monositler, makrofajlar ve polimorfonükleer nötrofilleri yıkıma uğratan PVL komponentlerinden S, 38 kDa; F, 32 kDa moleküler ağırlığındadır (29,32,33). Bu toksin komponentleri bir araya gelerek α -toksinlerin yapısına benzer por oluşumu sağlarlar. Ancak, α -toksinlerin aksine PVL nötrofilleri de lizise uğratar. PVL komponentleri tek başlarına toksik değildir fakat bir arada intravenöz olarak verildiklerinde granülositoza sebep olmalarına rağmen letal etki yapmazlar. Saflaştırılmış PVL komponentleri inhalasyon yoluyla fareye verildiğinde letal nekrotik akciğer infeksiyonuna yol açarlar (34). PVL, LukS-PV ve LukF-PV komponentlerinin bir araya gelerek oluşturdukları por oluşturan bir heptamerdir ve polimorfonükleer lokositlerin (PMN) membranlarına hasar verir (Şekil-2).



Şekil 2: PVL aracılıklı doku nekrozu (8 numaralı kaynaktan)

S. aureus'un diğer por oluşturan lokosidinlerinden farklı olarak, PVL hemolitik değildir. LukS-PV PMN'lerin yüzeyindeki henüz tam tanımlanmamış reseptörüne tutunur ardından LukF-PV ile dimer oluşturur. LukS-PV ve LukF-PV'nin birbirine bağlanmaları heptamer oluşturana kadar sürer. LukS-PV nin polimorfonükleer lökositlere bağlanmasıyla LukS-PV protein kinaz (A veya C) tarafından fosforillenir ve Ca^{++} kanallarının aktivasyonu gerçekleşir. Transdüksiyon sinyalinin indüklenmesi olasılıkla interlokin ve inflamatuvar mediatörlerin üretimini tetiklenmektedir (8).

PVL konsantrasyonuna bağlı olarak PMN'ler lizis ile parçalanabilir veya hücre apoptoza gider. Yüksek PVL konsantrasyonu PMN'leri lizis ederken düşük PVL konsantrasyonunda PVL doğrudan mitokondri membranına bağlanarak PMN'ler apoptoza yöneltir (Şekil-3).



Şekil 3: PVL'nin neden olduğu , PMN hücrelerindeki apoptoz ve doku nekrozu (8 numaralı kaynaktan)

Saflaştırılmış PVL ile yapılan çalışmalarda, PVL'nin doğrudan doku nekrozuna yol açmadığı görülmüştür. PVL'nin, doku nekrozu ve sepsis sonrası PMN'lerden salınan sitolitik hücre içeriği ile birlikte epitel hücreleri nekroza uğrattığı düşünülmektedir. PVL aracılıklı lizisin reaktif granülositlerden oksijen ara ürünleri ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerinin salınımını indüklemesi bu düşünceyi desteklemektedir (8).

PVL-pozitif CA-MRSA salgınları, kapalı yaşayan topluluklarda (hapisaneler, spor takımları, ordu ve homoseksüeller gibi) ve aynı zamanda sağlık personeli ve ailelerinde rapor edilmiştir (3). PVL-pozitif CA-MRSA suşlarının risk faktörlerinden bağımsız olarak genç insanlarda görülmesi kaygı uyandırmaktadır (3,35). Son zamanlarda PVL üreten MRSA suşları hayvanlarda da rapor edilmiştir (3).

CA-MRSA suşlarının ilk başlarda hastane kökenli olduğu, hastanelerden topluma yayıldığı düşünülmüştür (8). CA-MRSA'ların hastane kökenli MRSA

("Hospital-acquired" MRSA; HA-MRSA) izolatlarından genetik farklılıkları açıklandıkça CA-MRSA'ların farklı ve toplumda yaygın olan MSSA'lardan köken aldığı anlaşılmıştır (8).

Tüm dünyada *S. aureus* suşlarında *pvl* geninin görülme sıklığı <% 5 iken yeni ortaya çıkan CA-MRSA suşlarında bu genin görülme sıklığı farklı çalışmalarda % 77 ile % 100 arasında bildirilmiştir (36,37,38).

2.3.3.3. *S. aureus*'un epidemiyolojik özellikleri

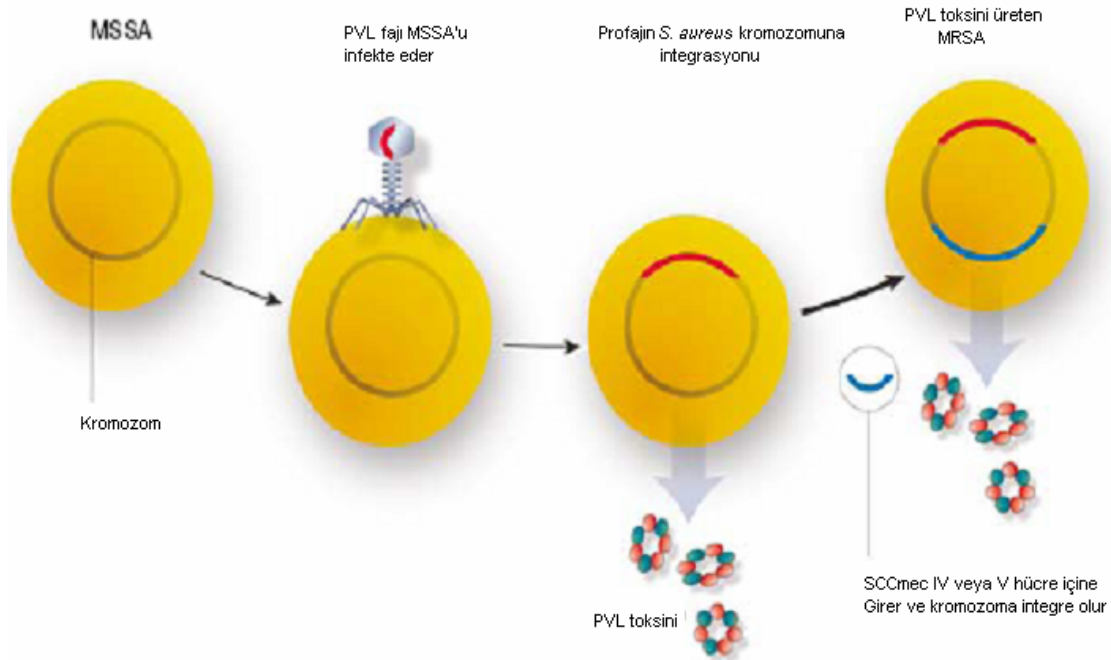
CA-MRSA suşlarını HA-MRSA suşlarından ayıran üç temel genotipik fark bulunmaktadır. Bunlar; genetik kökenlerinin farklı olması, metisilin direnci taşıyan genetik elementlerinin yapısal farklılıkları ve CA-MRSA suşlarının *pvl* geni bulundurmalarıdır (8).

HA-MRSA, genellikle büyük ve farklı direnç genlerini içeren Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*) tipleri I,II veya III (34-67 kb) taşıırken, CA-MRSA izolatları yeni tanımlanan küçük *SCCmec* varyantlarını (*SCCmec* tip IV (24 kb) veya daha nadir görülen *SCCmec* V veya onun bir varyantı olan VT) içerir. En büyük *SCCmec* elemanlar olan, tip II ve III β -laktam dışı antibiyotik direnç genlerini de içerir. Bu genler genellikle *SCCmec* IV ve V'te yoktur (8). *SCCmec* tip I,II,III içeren hastane kökenli metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) suşlarına göre, (*SCCmec*) tip IV ve V içeren CA-MRSA suşlarının metisilin direnç genini diğer *S. aureus* suşlarına aktarmaları *SCCmec* tip IV ve V'in daha küçük olması nedeniyle daha kolaydır (31).

CA-MRSA'lar ile HA-MRSA'lar arasındaki bir diğer farklılık CA-MRSA'larda *pvl* genlerini taşıyan bakteriyofaj Φ Sa2'nin CA-MRSA kromozomuna integre olmuş şekilde bulunmasıdır. *pvl* sıklıkla *SCCmec* tip IV taşıyan izolatlarda daha nadir olarak da *SCCmec* tip VT taşıyan izolatlarda bulunmaktadır (8).

1970'lerde *SCCmec* tip IV toplum kökenli *Staphylococcus epidermidis* suşlarında da gösterilmiştir (8). *S. aureus*'ta *SCCmec* IV'ün tanımlaması ancak 1980'li yıllarda yapılmıştır. Bundan yola çıkarak *SCCmec* tip IV'ün *Staphylococcus epidermidis*'den *Staphylococcus aureus*'a aktarıldığı düşünülmektedir (8).

Multilokus dizi analizi tiplendirme (“multilocus sequence typing; MLST) ve “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) yöntemleriyle CA-MRSA izolatlarının, dünyada farklı coğrafi bölgelerde yaygın bulunan predominant HA-MRSA klonlarından farklılıkları tanımlanmıştır (8,39,40,41). Farklı coğrafi bölgelerde CA-MRSA izolatlarının birbirinden farklı oldukları görülmüş ve bununla beraber aynı coğrafi bölgede de pek çok farklı genetik özellikteki CA-MRSA bulunduğu saptanmıştır (8).



Şekil 4: Bugün geçerli olan CA-MRSA orijini (8 numaralı kaynaktan)

Genetik özellikleri ve antibiyogram sonuçları birbirinden farklı olsa da hemen hemen tüm toplum kökenli metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) suşlarında Panton-Valentin lokösidin (PVL) kodlayan virulans geni (*pvl*) bulunmaktadır.

CA-MRSA suşlarının PVL virulans faktörü ile sağlıklı bireylerde açık deri lezyonları yapması bu suşların bireyden bireye temas yoluyla yayılımı için bir avantaj sağlamaktadır (8).

2.3.3.4. Eksfoliatif Toksin

1971 yılında bulunmuştur. Epidermolitik toksin ya da eksfoliyatin olarak da adlandırılır. 'Haşlanmış Deri Sendromu' na neden olmaktadır. Eksfoliatif toksinin A (ETA) ve B (ETB) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Eksfoliatin A, 100°C'ye 20 dakika dayanabilmektedir. Eksfoliatin B ise 60°C'de 30 dakika ısıtılınca harap olur. Eksfoliatif toksin A geni kromozomal, eksfoliatif toksin B geni plazmid kökenlidir. Eksfoliatif toksinler, bakteri proteazları grubundandır (27). ETA, hücre adezyon moleküllerinin katedrin ailesinin bir üyesi olan desmosomal protein olan desmoglein-1'i parçalayarak etki gösterir (15, 16, 26).

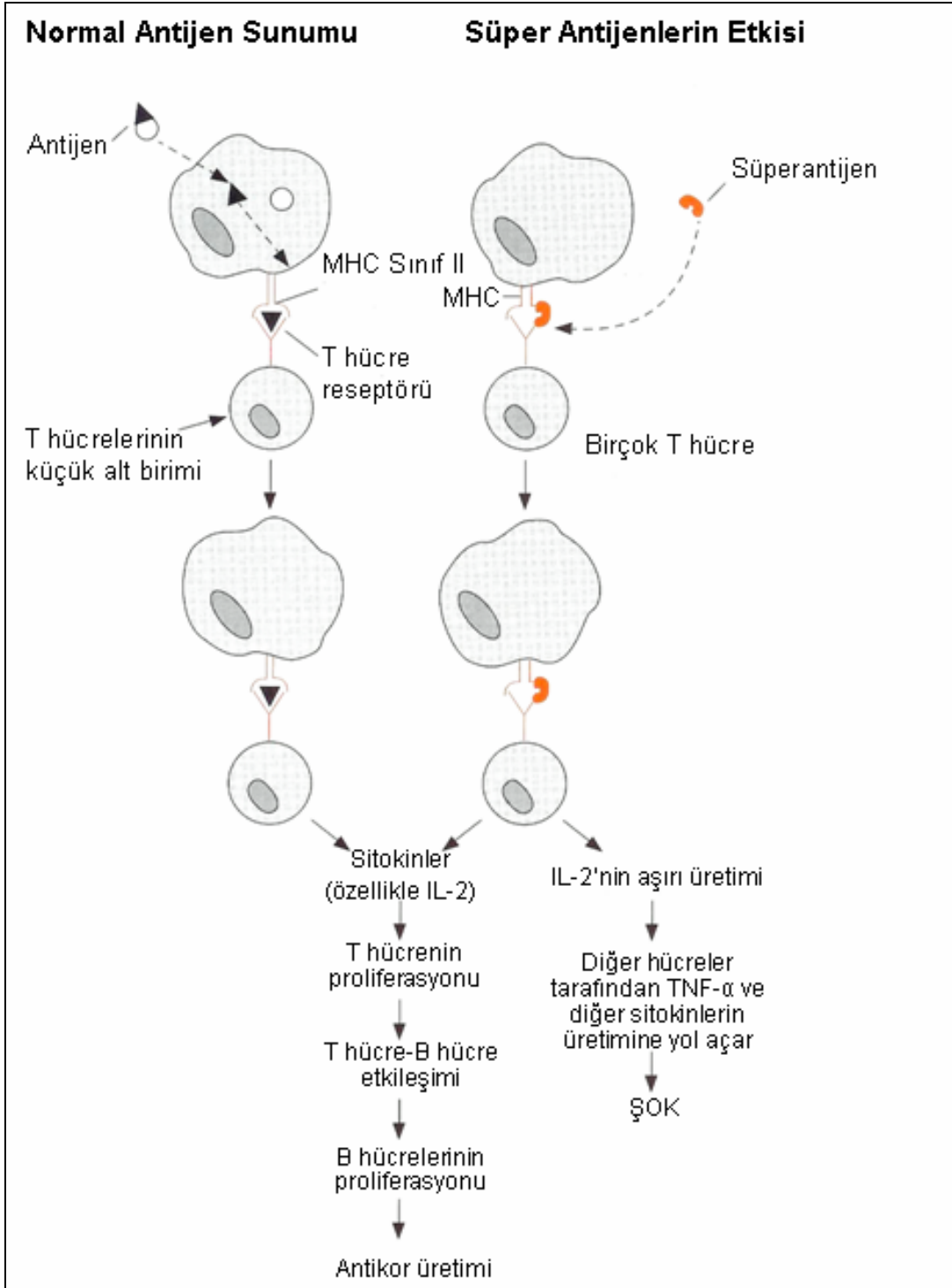
2.3.3.5. Enterotoksinler

S. aureus'un immünolojik olarak birbirinden farklı A, B, C (C1- C3), D, E ve F olarak adlandırılmış sekiz enterotoksini bulunmaktadır. Enterotoksin F günümüzde Toksik Şok Sendrom Toksini-1 olarak adlandırılmaktadır. Enterotoksinler, ısıya dirençli olup 100°C'de 30 dakika dayanabilmektedir. Tek zincirli ve polipeptit yapıdadır. Enterotoksin A ve D üreten suşlar, besin zehirlenmelerine neden olurken, enterotoksin B üretenler genellikle hastane infeksiyonlarından sorumludur. Tüm enterotoksinler süperantijen niteliğindedir (16,26).

2.3.3.6. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

Bakteriyofaj kaynaklı olan bu toksin, faj-1 grubundaki 29 ve 52 faj tipleri tarafından oluşturulmaktadır (16).

S. aureus iki sınıf süperantijen üretmektedir. Bunlar TSST ve stafilokokal enterotoksinlerdir (SE). TSST, tst geni tarafından kodlanır, toksik şok sendromundan sorumludur. Süperantijenik uyarım sonucu salınan sitokinlerin güçlü etkisi nedeniyle TSST, şok ve ölüme neden olmaktadır (Şekil 5). SE'ler ise gıda zehirlenmelerine neden olurlar. Gıda zehirlenmeleri TSS gibi ölümcül değildir ancak daha yaygın olarak görülür. SE, ent genleri tarafından kodlanır. Gıda üzerinde bakteriler tarafından üretilmiş olan enterotoksin; gıdanın yenmesi ile birlikte vücuda alınır ve midede kusma refleksi kontrol eden vagus sinir uçlarını uyarır. Şüpheli gıdanın alınmasından üç-altı saat sonra başlayan projektıl kusma ve karın ağrısı *S. aureus* enterotoksinleri nedeni ile gelişen gıda zehirlenmesinin klasik belirtileridir. tst ve ent genleri bakteriyofaj kökenlidir (27).



Şekil 5: Süperantijenik uyarım (Kaynak 27'den alınmıştır)

2.4. Virulans Genlerinin Düzenlenmesi

S. aureus virulans genlerinin çoğu, özellikle yüzey adezinlerini ve ekzoproteinleri kodlayanlar, bir çevresel algılama ('quorum sensing') sistemi tarafından düzenlenirler. Adezin genleri, üremenin erken safhalarında eksprese edilir. Bakteri logaritmik üreme fazına girip bakteri sayısı çok arttığında adezin üretimi azalır ve ekzoprotein üretimi artar. Düzenleyici sistemin merkezi, *agr* genleridir. *agr* genleri, Agr A-D proteinlerini kodlarlar. Diğer bir düzenleyici gen de *sarA*'dır (27). *sarA* geni, gen promotorlarının hemen üstündeki dizilere bağlanan SarA proteinini kodlar. SarA, Agr yapımını uyarır. *agr* genlerinin ekspresyonu üreme fazına bağlıdır. Logaritmik üreme fazında bakteri Agr proteinlerini düşük düzeyde üretir. AgrD sitoplazmik membran proteini olan AgrB tarafından salgılanır ve tiyolakton adlı siklik peptidi meydana getirecek şekilde kesilir. Bu peptit bir 'oto indükleyici' olarak görev yapar. Bu oto indükleyicinin yapısı Gram negatif bakteriler tarafından üretilenlerden çok farklıdır ve hücre zarından kolayca difüze olmaz. Zardan geçebilmek için sitoplazmik zarında bulunan reseptörüne bağlanmak zorundadır. Tiyolaktonun etki gösterebilmesi için hücre zarında bulunan bir sensör protein olan AgrC'ye bağlanması gereklidir. Konsantrasyonu yeterince arttığında, tiyolakton AgrC'nin fosforile olmasına neden olur. Fosforillenmiş AgrC ise, AgrA'yı fosforiller. Fosforillenmiş AgrA da RNA III adı verilen bir RNA molekülünün yapımını uyarır. RNA III, hücre yüzey adezinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu azaltırken, TSST, hemolizinler ve SEB gibi ekzotoksinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırır (27).

2.5. Patogenez ve Yaptığı Hastalıklar

S. aureus, doğada sık rastlanan bir bakteridir. İnsanda, burun delikleri, koltuk altı, vagina, farinks, hasarlı deri yüzeyi gibi vücudun değişik bölümlerine kolonize olabilmektedir. Enfeksiyon, deri ve mukoza bütünlüğünün bozulmasının ardından bakterinin dokuya ya da kana geçmesiyle başlar (14,42). *S. aureus*, deri enfeksiyonlarında yağ ve ter bezleri ile kıl köklerini giriş için kullanabilir. Genel olarak enfeksiyon oluşumunu etkileyen faktörler; insan savunma mekanizmaları, bakterinin sayısı ve virulansı, deri ve mukoza bütünlüğüdür (42).

Yaşamı tehdit edici boyutta olan stafilokok enfeksiyonları içinde, stafilokoksik bakteriyemi, endokardit ve sepsis bulunmaktadır. Bu tablolar enfeksiyon için çeşitli risk faktörleri bulunan kişilerde daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. aureus* enfeksiyonu gelişme riskini arttıran ve

konağa bağlı olan faktörler şunlardır:

- 1 Konjenital ya da kazanılmış lökosit kemotaksis defektleri
- 2 Hücre içi öldürme mekanizmalarındaki sorunlar
- 3 Oponizasyon defektleri
- 4 Deri yaralanmaları
- 5 Yabancı cisim varlığı
- 6 Virüs infeksiyonları
- 7 Kronik hastalıklar
- 8 Tedavi/ profilaktik amaçlı antibiyotik kullanımı

Stafilokok bakteriyemisi endokardit, metastatik infeksiyon veya sepsis sendromuna yol açabilmektedir (15,42). Stafilokok infeksiyonlarında tipik patolojik bulgu, abse oluşumudur.

Yalnızca potansiyel bir hedef olması nedeniyle değil aynı zamanda aktivasyonu ile endovasküler hastalığın ilerlemesine katkıda bulunması nedeni ile patojenik süreçte en önemli yapı, endotel hücreleridir. Stafilokoklar endotel hücrelerine kolaylıkla tutunarak adezyon-reseptör etkileşimi ile bağlanır, ardından endotel hücreleri tarafından hücre içine alınırlar (20). Bunun ardından, bakteri komşu dokulara yayılmayı ve kan dolaşımına girmeyi kolaylaştıran proteolitik enzimler salgılar. Enfekte endotel hücrelerinin eksprese ettiği doku faktörü, fibrin birikimi ve vejetasyon oluşumunu kolaylaştırır. Bakteri derin dokulara ulaştığında, abse oluşumuna yol açan inflamatuvar yanıtı neden olur. Olaylar zinciri kardiyak endotelin etkilendiği endokardit patogeneğinde olduğu gibi metastatik infeksiyon odaklarının oluşmasına da katkıda bulunur. *S. aureus*'un hücre içine girmesiyle, endotel hücreleri, Fc reseptörleriyle beraber çeşitli adezyon moleküllerini (vasküler hücre adezyon molekülleri 'VCAM' ve intersellüler adezyon molekülü 'ICAM') eksprese ederler ve interlökin (IL)-1, IL-6 ve IL-8 salınımını sağlarlar. Fc reseptörlerinin ekspresyonu immünoglobulin (Ig) veya immün kompleksler için bir bağlanma bölgesi oluşturup bakteriyemi sırasında bazen görülen vaskülit gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Bakteri kökenli kemotaktik faktörlerin ve IL-8'in etkisiyle, nötrofil lökositler

infeksiyon bölgesinde diapedez ile gelip yukarıda belirtilen adezyon moleküllerini eksprese eden endotel hücrelerine tutunurlar. Endotel hücrelerinin yapısındaki değişiklikler plazma proteinlerinin transüstasyonuyla birlikte damar geçirgenliğinin artmasına neden olur. Stafilocoklar ile temastan sonra hem doku makrofajları hem de dolaşımdaki monositler IL-1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) salgırlar. T hücrelerinden interferon- γ (IFN- γ) salınımından sonra makrofajlar aktive olurlar. Endotel hücreleri gibi monosit veya makrofajlardan kan dolaşımına salınan sitokinler de sepsis sendromunun belirtilerine ve stafilocok hastalığı ile ilişkili vaskülite katkıda bulunurlar (43,44).

S. aureus süperantijenleri yüksek ateş, şok, kapiller kaçak ve çoğul organ yetersizliğiyle karakterize olabilen yaşamı tehdit eden tablolara da yol açabilmektedir (25).

2.6. Stafilocokların Laboratuvar Tanısı

2.6.1. Gram Boyama ve mikroskopik inceleme

Klinik örneklerden hazırlanan Gram boyalı preparatlarda, stafilocoklar 0.5-1.0 μm çaplı Gram pozitif koklar olarak görülür. Tek tek, çiftler, kısa zincirler yada kümeler halinde görülebilir. Gram reaksiyonundaki değişimler inflamatuvar hücreler ve onların hidrolitik enzimlerinin etkisi nedeniyledir (45).

2.6.2. Koloni Morfolojisi

Çoğu stafilocok türleri 24 saatlik inkübasyonda 1-2 mm çaplı koloniler oluştururlar. *S. aureus* kolonileri sarı-turuncu pigmentli, düzgün yüzeyli, hafif konveksdir. Diğer suşlar ise beyaz gri koloniler oluştururlar. *S. aureus* ve diğer KNS' lerde pigment üretimi inkübasyon sonrasında oda sıcaklığında bekletildiğinde daha belirgin hale gelmektedir. Bazı *S. aureus* ve bazı KNS suşlarında opak koloniler ve şeffaf koloniler veya farklı beta-hemoliz zonları bulunur. Beta-hemoliz inkübasyon uzatılırsa belirginleşir (45).

2.6.3. Katalaz Testi

Bu test *Micrococcaceae* ailesindeki katalaz enzimlerinin varlığını saptar. Lam üzerine %3 hidrojen peroksit damlatılarak yapılır. Hemen oluşan kabarcıklar hidrojen peroksitin su ve oksijen gazına dönüşümünün göstergesidir (45).

2.6.4. *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayıran yöntemler

2.6.4.1. Lam Koagülaz Testi

Bu test için kanlı agar, CNA agar veya diğer selektif olmayan besiyerlerinde üremiş koloniler kullanılır. Lam üzerine bir damla distile su damlatılır. Stafilokok kolonileri su ile karıştırılarak homojen süspansiyon elde edilir. Üzerine bir damla plazma damlatılır ve elde çevrilerek karıştırılır. On saniye içinde *S. aureus*'un birbirine yapışmasından kaynaklanan gözle görülen kümeleşmenin olduğu gözlenirse test pozitifdir. Lam koagülaz testi *S. aureus* duvarındaki 'clumping factor'ün varlığını gösterir. Otoaglutinasyona neden olduğu için yüksek tuz içeren besiyerlerinde üremiş koloniler kullanılmaz. Eğer lam koagülaz negatif ise tüp koagülaz testi yapılmalıdır. *S. aureus* dışında, *Staphylococcus lugdunensis* ve *Staphylococcus schleiferi*'nin de lam koagülaz testinde pozitif sonuç verebilmektedir (16).

2.6.4.2. Tüp Koagülaz Testi

Hücre dışına salınan koagülazı gösterir. Serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma içinde stafilokok kolonisi ezilip karıştırılır. Saat başı kontrol edilmek suretiyle 35°C'de dört saat pıhtının oluşması için bekletilir. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif olan testler oda sıcaklığında 18-24 saat bekletilir. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* türlerinin de tüp koagülaz testi pozitifdir (16).

2.6.4.3. Mannitol Hidrolizi

Bu test için mannitollü tuzlu agar kullanılır. Bu besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonilerinin etrafında 48 saatte sarı zon, *S. epidermidis* kolonilerinin etrafında kırmızı zon oluştuğu gözlenir. *S. aureus*, mannitolü fermente ederek, besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayırıcının rengini sarıya çevirir (16).

2.6.4.4. Protein A Saptanması

Protein A saptama yöntemi, lam koagülaz testine bir alternatiftir. Protein A, IgG'nin Fc kolu için spesifik afiniteye sahiptir. Protein A'yı saptamak için ticari olarak bulunan insan

fibrinojen ve IgG'si ile kaplı polistren lateks partikülleri içeren ayrıçtan reaksiyon kartına bir damla damlatılır. Stafilocok kolonisi tahta uygulama çubuğu ile karıştırılır ve kart 20 saniye çevrilir, aglütinasyon gözlemlenir. Aglütinasyonun meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif olan testlerde herhangi bir değişim olmaz. *S. aureus*, protein A testi pozitif, *Staphylococcus epidermidis* ise negatif sonuç verir (16).

2.6.4.5. Hızlı Termonükleaz Testi:

Bir mililitre Beyin Kalp İnfüzyon (BKİ) sıvı besiyeri içerisine birkaç stafilocok kolonisi aktarılır. 35°C'de iki saat inkübe edilir. Su banyosunda 15 dakika süspansiyon kaynatılır, oda sıcaklığına soğutulur. DNase test agarı üzerinde pipet yardımıyla açılan oyuklara iki damla soğutulan organizma süspansiyonu eklenir. Bir-iki saat 35°C'de inkübe edilir. Kuyucuklar etrafında pembe yada kırmızı hale görülmesi (pozitif reaksiyon) izlenir. *S. aureus*, termonükleaz testi pozitifdir (16).

2.7. Stafilocok İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılabilen Antibiyotikler

Stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde seçilecek uygun antibiyotik, bakteriyi öldürerek yayılımını engellemelidir (14). Bu amaçla kullanılacak antibiyotikler;

- 1 Hücre duvarı sentez inhibitörleri
- 2 Protein sentez inhibitörleri
- 3 Nükleik asit sentezi inhibitörleri olmak üzere üç grupta incelenebilir.

Bu grup antibiyotiklerden en uygun olanı, antibiyotik duyarlılık testleri ile belirlenmeli ardından antibiyoterapiye başlanmalıdır. Genellikle kültür ve antibiyogram sonucu beklenmeden, kültür için örnek alınır alınmaz empirik tedaviye başlanır. Empirik tedavide uygulanan antibiyotik, kültür ve antibiyogram sonucuna göre değiştirilir.

2.7.1. Hücre Duvar Sentez İnhibitörleri

2.7.1.1. Beta-laktam Antibiyotikler

Kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan geniş bir antibiyotik grubudur. Bu antibiyotikler, hücre duvarı sentezinin transpeptidasyon aşamasında görev alan transpeptidaz

ve karboksipeptidaz enzimlerine bağlanıp peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Bu nedenle bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) de denilmektedir.

Beta laktam antibiyotikler beta-laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş temel sınıfa ayrılırlar (46,47).

2.7.1.1.1. Penisilinler

Tiazolidin halkasına bir beta-laktam halkasının eklenmesiyle oluşan 6-aminopenisilanik asit çekirdeği taşıyan antibakteriyel ajanlardır. Bakterisidal etkilidirler. Bu grup antibiyotikler, doğal penisilinler, penisilinaza dayanıklı semisentetik penisilinler, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler olarak sınıflandırılırlar. Penisilin G (benzil penisilin) bilinen en önemli doğal penisilindir. Benzil yan zincirinin 6-aminopenisilanik asit çekirdeğine eklenmesiyle oluşmuştur. Penisilin G, beta-laktamazlar ile inaktive olur. Penisilin G'nin beta-laktamazlara inaktivasyonu yan zincirlere metil veya etil grupları içeren büyük aromatik halkaların eklenmesi (metisilin, nafsilin, oksasilin) ile önlenmiştir. Bu antibiyotikler, penisilinazlara dirençli penisilinler olarak adlandırılırlar (46,47).

2.7.1.1.2. Sefalosporinler

Bir beta-laktam halkası ile dihidrotiozin halkasının birleşmesinden oluşmuş 7-aminosefalosporanik asit çekirdeği içerir. Sefalosporinler, etki spektrumlarındaki genişlemeye paralel olarak 1.- 4.kuşak sefalosporinler şeklinde adlandırılmaktadır. Bu antibiyotikler bakterisidal etkilidirler. Ancak tüm beta-laktamlar gibi metisiline dirençli *S. aureus* ve *S.epidermidis* izolatlarına karşı etkisizdirler. Birinci kuşak sefalosporinler, Gram pozitif bakterilere karşı iyi, Gram negatif bakterilere karşı orta derecede etkilidirler. İkinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere doğru gidildikçe ilacın Gram negatif bakterilere olan etkinliği artmakta, Gram pozitif bakterilere karşı olan etkinliği azalmaktadır (46). Son yıllarda geliştirilmiş ve Faz 3 aşamasında olan seftobiprol ise, PBP 2a'ya ve pnömokoklardaki PBP 2x'e bağlanabilmesi nedeniyle MRSA izolatlarına ve penisilin dirençli pnömokoklara etkilidir.

2.7.1.1.3. Karbapenemler

Yapıları penisilin ve sefalosporinlerden farklı olan karbapenem grubu antibiyotiklerin halkasında

sülfür veya oksijen atomları yerine hidroksietil yan zincirleri bulunmaktadır. Genellikle beta-laktamazlara dirençlidirler. Ancak metisiline dirençli stafilokoklar, düşük afiniteli PBP yapımı nedeniyle karbapenemlere de dirençlidirler (46).

2.7.1.2. Glikopeptit Antibiyotikler

Bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezi sırasında pentapeptit yan zincirlerinde bulunan D-alanil-D-alanin dipeptidi ile birleşerek peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Glikopeptitler (vankomisin ve teikoplanin) metisiline dirençli *S. aureus* ve KNS'lerin yol açtığı infeksiyonların tedavisinde ilk seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (46).

2.7.2. Protein Sentez İnhibitörleri

Pek çok antibiyotik, insanlarda bulunmayan bakteriyel 30S ve 50S ribozom alt birimlerine etki ederek insan hücrelerindeki protein sentezine zarar vermeden bakteriyel protein sentezini inhibe edebilmektedir.

2.7.2.1. Aminoglikozidler

Bir aminosiklitol halkasına aminoşekerlerin glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşurlar. Streptomisin, neomisin, kanamisin, tobramisin ve gentamisin doğal olarak elde edilen aminoglikozidlerdir. Aminoglikozidler, bakterinin 30S ribozomal alt ünitesine geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Stafilokoklara etkili oldukları halde beta-laktamlar veya glikopeptitlerle kombine edilerek kullanılmaları önerilmektedir (47).

2.7.2.2. Makrolidler

Makrolidler, 50S ribozom alt ünitesine bağlanarak peptit zincirinin uzamasını önler. Bakteriyostatik etkileri vardır. Grubun prototipi eritromisindir (47).

2.7.2.3. Oksazolidinonlar (Linezoid)

Bu antibiyotik, N-formylmethionyl tRNA- mRNA- 30S üçlü kompleksini etkileyerek, protein sentezini bozar. Bakteriyostatik etkilidir. Linezoid, özellikle metisiline dirençli *S. aureus* yanı sıra penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* için de kullanılabilir (48).

2.7.2.4. Streptograminler

Bu antibiyotikler, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak etkisini gösterir. Özellikle dirençli Gram pozitif bakteri infeksiyonlarında etkilidir. Kimyasal olarak streptogramin A ve B olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu iki grup birbirleriyle sinerjik etkilidir (22).

2.7.2.5. Linkozamidler

Bakteriyel 50S ribozom alt ünitesine bağlanır, peptit zincirinin uzamasını engeller. Bu grup antibiyotiklerden özellikle klindamisin, metisiline duyarlı stafilokok infeksiyonlarında etkili olmaktadır (47,48).

2.7.2.6. Kloramfenikol

50S ribozomal alt üniteye bağlanır. Yeni peptit bağlarının sentezini önler. SCCmec içerisindeki ek direnç genlerine bağlı olarak metisiline dirençli *S. aureus* suşlarına etkili değildir (43). Kloramfenikol insan hücrelerinde bulunan 60S ribozomal alt üniteyi etkilememesine rağmen insan hücrelerindeki mitokondrilerde 50S alt ünite bulunduğu için, mitokondrilerdeki protein sentezini inhibe ederek kemik iliğinde doza bağımlı toksik etkiler ortaya çıkabileceğinden klinik kullanımı kısıtlıdır (46,47).

2.7.3. Nükleik Asit Sentezi İnhibitörleri

2.7.3.1. Sülfonamidler ve Trimetoprim

Sulfonamidler, yapısal olarak benzedikleri paraaminobenzoik asit (PABA) ile yarışarak dihidrofolat sentezini inhibe ederler. Trimetoprim ise dihidrofolat redüktazı inhibe ederek dihidrofolattan tetrahidrofolat sentezini engeller. Sonuçta bakteriyel DNA sentezi engellenir. Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) kombinasyonu MRSA suşları da dahil olmak üzere pek çok Gram pozitif kok ve Gram negatif basile etkilidir ancak bakteriyostatik olması nedeniyle yaşamı tehdit eden infeksiyonların tedavisinde uygulanmaz (49,50).

2.7.3.2. Kinolonlar

Çift halkalı kinolon çekirdeği içeren antibiyotiklerdir. Kinolon çekirdeğine flor atomunun eklenmesiyle florokinolonlar türetilmiştir. Bakterisidal etkilidirler. Bakterilerde DNA'nın süper

sarmalının oluşması ve replikasyon sırasında DNA iplikçiklerinin açılması için gerekli olan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederler. *S. aureus* ve KNS'lerde iyi derecede etkilidirler (49).

2.7.3.3. Rifampin

Bakterisidal etkili bir antibiyotik olan rifampin bakteriyel DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi ile stabil bir kompleks oluşturup bakteriyel RNA sentezini önler. Stafilokok infeksiyonlarında tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişimi gözlenir. Metisilin ve glikopeptid dirençli stafilokok infeksiyonlarında diğer antibiyotiklerle kombine olarak kullanılabilir (49).

2.8. Stafilokoklarda metisilin direnci ve epidemiyolojisi

Direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir (51).

Antibiyotik çağının başlangıcından beri antibiyotik kullanımının oluşturduğu seçici baskı stafilokoklarda çok kısa sürede direnç gelişmesine yol açmıştır (52). Bu durum 1941'de penisilin G'nin tedaviye girmesi ile beta-laktamaz üretimine bağlı direnç gelişmesi ile başlamış, bundan sonra da her kullanıma giren antibiyotiğe karşı direnç gelişimi ile sürmüştür. Epidemik klonlar, henüz 1950'li yıllarda biribiri ardına penisilin G, streptomisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve daha sonra da makrolidlere direnç kazanmıştır (53).

Çoklu dirençli *S. aureus* suşlarının o yıllardaki en önemli temsilcisi 80/81 (faj tipi) olarak adlandırılan izolatlardır. Bu izolatlar günümüzde kullanılan MLST ("multilocus sequence typing") tekniği ile ST30 klonunda yer almaktadır. Bu izolatların bir kısmının Panton-Valentin Lökositini (PVL) ürettiği de gösterilmiştir. 80/81 klonu hastaneler ve toplumda yayılmış ve özellikle deri ve derin yumuşak doku infeksiyonlarına yol açmıştır. *S. aureus* 80/81 1950'lerde tüm dünyaya yayılmıştır. 1959 yılında metisilin tedavisiyle girmesi ile bu klonun izolasyon sıklığında düşme olmuştur fakat, son yıllarda 80/81 klonu özellikle Avrupa ülkelerinde toplum kökenli MRSA olarak tekrar karşımıza çıkmıştır (54).

İlk MRSA olguları metisilin kullanıma girmesinden iki yıl sonra 1961 yılında İngiltere'de bildirilmiştir. O zamandan günümüze MRSA klonları tüm dünyada bu arada ülkemizde de

yayılmıştır. Ülkemizden 11 laboratuvarın katıldığı ve Akdeniz ülkelerinde antibiyotik direncini izlemeyi hedefleyen ARMed çalışmasına göre kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında MRSA oranı 2003, 2004 ve 2005 yılları için sırası ile %43, %40 ve %35'dir (55). Farklı laboratuvarlara göre oranlar %21 ile %70 arasında değişmektedir (Armed raporu www.earss.rivm.nl) İzolatların %35'i çoklu dirençlidir (>3 antibiyotiğe dirençli) ve bu oran ARMed'e katılan ülkeler arasında en yükseğidir. SENTRY çalışmasında da ülkemiz için MRSA oranı %30.9 olarak bildirilmiştir (56). MRSA izolatlarının prevalansı özellikle yoğun bakım ünitelerinde % 80'ni geçmiştir (%84) (34). Dünyadaki oranlar da farklı değildir. SENTRY sürveyans programında 1997-1999 yılları arasındaki MRSA prevalansının Avustralya için %22.4, Japonya için %66,8, Latin Amerika ülkeleri için %34.9, ABD için %32.4 ve Avrupa ülkeleri için %26.5 olduğu görülmüştür (57,58).

Avrupa'da MRSA prevalansı ülkeler arasında değişmektedir. Kuzey Avrupa ülkeleri ve Hollanda'da prevalans %1-2 iken, doğu ve güneye inildikçe prevalans artmaktadır (EARSS 13)

2.9. Staphylococcus cassette chromosome *mec* (SCC *mec*)

Staphylococcus cassette chromosome *mec* (SCC *mec*), stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli elemanlardır. SCC elemanları, değişik KNS türlerinde ve metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarında da bulunmaktadır. *S. aureus*'da metisilin direncinden sorumlu olan *mecA* geni de SCC*mec* adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesinde bulunmaktadır. SCC*mec*, bakteriyofajlar, transpozonlar, konjugatif transpozonlar veya integre olabilen plazmidler gibi bilinen diğer hareketli genetik elemanlardan farklıdır. Genomik bir ada olarak görülebilse de *S. aureus* 'un virulansı ile ilişkili hiçbir gen içermediği için patojenite adalarından farklıdır (59,60).

S. aureus' taki metisilin direnci *mecA* geni tarafından kodlanır. *mec A* varlığı "Düşük afiniteli penisilin bağlayan protein-2a" üretimi anlamına gelir. Yukarıda da belirtildiği gibi, *mecA* geni SCC*mec* içinde yer almaktadır. Şimdiye kadar MRSA'larda altı farklı SCC*mec* tipi tanımlanmıştır (2,61). SCC*mec* tiplendirmesi, hastane kökenli MRSA'larla (HA-MRSA) toplum kökenli MRSA'ların (CA-MRSA) birbirlerinden farklı olduklarını kanıtlar. Tüm dünyada izole edilen SCC*mec* tip I, II ve III en çok HA-MRSA suşlarında, tip IV ve V çoğunlukla CA-MRSA suşlarında bulunmaktadır (2). SCC*mec* tip IV izolatları genellikle, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, abseler ve ameliyat sonrası infeksiyonlardan izole edilirken SCC*mec* tip II suşları

daha sıklıkla çocuk ve yetişkinlerin solunum yolu infeksiyonlarından izole edilmiştir (2). Farklı tiplerdeki SCC*mec* elemanlarının büyüklüğü 20.9 kb.den-66.9 kb.ye kadar değişmektedir. SCC*mec* Tip I (34.3 kb), IV (20.9-24.3 kb) ve V (28 kb), sadece beta-laktam direnci kodlarırken, SCC*mec* tip II (53.0 kb) ve III (66.9 kb) çoklu dirence 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 taşımalarıdır. Plazmid pUB110, kanamisin, tobramisin, bleomisin direncinden sorumlu ant(4') genini; pI258 penisilin ve ağır metal direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşırken, Tn 554 ise indüklenebilir MLSb tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır. *S. aureus* SCC*mec* dışında kromozomun değişik bölümlerinde ya da plazmidler üzerinde de direnç elemanları içermektedir.

SCC*mec* içinde ayrıca insersiyon dizileri (ör. IS 431) ve *mecA* transkripsiyonun düzenleyen genler (ör; *mec* R1 (SCC*mec* tip I, IV ve V) veya *mec* R1 ve *mec* I (tip II ve III)) de bulunmaktadır. Bu genler *mec* gen kompleksi içinde yer alır. Günümüze kadar *mec* gen kompleksleri ile ilgili 5 temel sınıf (A-E) tanımlanmıştır (1).

SCC *mec* elemanında ayrıca kromozomdaki spesifik bir bölgeye integrasyon ve bu bölgeden ayrılma için kaset kromozom rekombinazlarını kodlayan genler de (*ccr*) bulunmaktadır. SCC*mec* *S. aureus* kromozomunda spesifik bir bölge olan attB*sc*c bölgesine entegre olur. Bu bölge orfX olarak adlandırılan ve işlevi bilinmeyen bir açık okuma çerçevesinin 3' ucundadır. *ccr* genleri SCC*mec* tip I'de *ccr* A1 ve *ccr*B1; SCC*mec* tip II ve tip IV'de *ccr* A2 ve *ccr* B2; SCC*mec* tip III'de *ccr* A3 ve *ccr* B3; SCC*mec* tip VI taşıyan HDE 288 MRSA suşunda *ccr* A4 ve *ccr* B4; SCC*mec* tip V'de *ccr* C olarak adlandırılır.

SCC*mec*'de yer alan *mec* ve *ccr* komplekslerinin etrafındaki dizilere ise J ("junkyard") bölgeleri adı verilmektedir. Tüm SCC*mec* elemanları üç bölgeye ayrılır: J1 bölgesi kromozomun sağ yanından *ccr* genlerine kadar, J2 bölgesi *ccr* geninden *mec* kompleksine kadar uzanır. J 3 bölgesi ise *mec* kompleksi ile SCC*mec*'in sol ucu arasında yer alır (3). Temel SCC*mec* tipleri yanı sıra birçok varyant da tarif edilmiştir. Örneğin, I A , II (A- G), III (A ve B), IV (a/b, c,d,E, F, g).

SCC*mec*-II ve SCC*mec*-IV taşıyan izolatların üretildikleri klinik örnekler, önemli derecede farklılık gösterir. Genel olarak SCC*mec*-II izolatları solunum yolu örneklerinden izole

edilirken SCCmec-IV izolatları deri, yumuşak doku, apseler ve ameliyat sonrası yaralarından izole edilmektedir.

pvl geni SCCmec-IV taşıyan suşlarda %90'ın üzerinde pozitif bulunurken, bu oran SCCmec-II taşıyan izolatlarda % 0,3' ün altındadır. Ayrıca SCCmec-IV suşları içinde PVL geninin insidansı çocuklarda yetişkinlere göre önemli derecede fazladır (2).

2.10. *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi ve Tiplendirme Yöntemleri

Bakteriyel suşların tiplendirilmesi salgınların ve nozokomiyal yayılımın araştırılmasında ve suşlar arası evrimsel ilişkilerin incelenmesinde önem taşımaktadır. MRSA izolatlarını birbirinden ayırtetmede kullanılan bir çok tiplendirme yöntemi geliştirilmiştir (62).

Tiplendirme yöntemleri temel olarak Fenotipik (geleneksel) ve genotipik (moleküler) tiplendirme olmak üzere iki kategoriye ayrılır (19).

2.10.1.Fenotipik yöntemler

Geleneksel veya konvansiyonel yöntemler olarak da bilinen fenotipik yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymaktadır. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ortaya koyan biyotipik profillerine, antibiyotik duyarlılıklarına, duyarlı oldukları faj tiplerine, protein içerikleri gibi birçok özelliklerine dayalı fenotipik yöntemler mevcuttur. Fenotipik farklılıkları ortaya koyan tiplendirme yöntemlerinin temel dezavantajı mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini değiştirme eğilimleridir. Bu değişiklikler önceden tahmin edilemez ve değişen çevre koşullarına bir yanıt olarak ortaya çıkmış olabilirler. Buna ilaveten serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi pek çok fenotipik yöntem, çeşitli özgül reaktanlara gereksinim duyarlar. Ayrıca bir tek nükleotide meydana gelen nokta mutasyonları herhangi bir fenotipten sorumlu genin fonksiyonu veya regülasyonu bozabilir. Böylece fenotipik olarak farklı, ancak genotipik olarak ayırtedilemez veya hemen hemen aynı olan izolatlar da ortaya çıkabilmektedir (63). Tam tersi olarak genetik olarak birbirleriyle ilişkisiz izolatların antibiyogramları birbiriyle aynı olabilmektedir. Bir başka fenotipik tiplendirme yöntemi olan faj tiplendirmesiyle ise bir çok *S. aureus* izolatı tiplendirilememektedir (62).

S. aureus tiplendirmesinde kullanılan 4 fenotipik yöntem bulunmaktadır;

- 1 Antimikrobial Duyarlılık Testleri
- 2 Biyotiplendirme
- 3 Faj tipi
- 4 MLEE (Multilokus Enzim Elektroforezi)

2.10.1.1. Antimikrobial Duyarlılık Testleri

Yeni veya alışılmadık bir antibiyotik direnç paterninin tanımlanması sıklıkla bir salgının ilk göstergesi olabilir (64,65). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları çoğu bakteriyel izolatların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarını rutin olarak test etmektedirler. Konvensiyonel ve otomatize antibiyogram sistemlerinin her ikisi de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test yöntemlerinin kalite kontrolleri zor, ancak uygulamaları kolay ve göreceli olarak daha ucuzdur (65). Bununla birlikte antibiyotik direnç fenotiplerindeki değişkenlikler nedeniyle antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik olarak değeri sınırlıdır. Farklı izolatlar aynı direnç paternine sahip olabilecekleri gibi, bir izolat plazmit veya transpozonlar aracılığıyla çoklu antibiyotik direnci geliştirebilir (63).

Kalitatif antibiyotik duyarlılıklarına göre (duyarlı-dirençli) yapılan sınıflandırmalar ilişkisiz suşları ayırt etmede yetersizdir. Bunun yerine, kantitatif antibiyogram yani antibiyotik duyarlılık zon çaplarına göre sınıflandırma yapmak, antibiyogramın tiplendirme gücünü artırır (62,65). Antibiyotiplendirme tek başına kullanılamaz, ancak bazen endemik veya epidemik bir klonun tanımlanmasında yararlı bir tarama yöntemi olabilir (66).

2.10.1.2. Biyotiplendirme

Biyotiplendirme ile bir izolatın biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojisi ve çevresel şartlara toleransı (bazı besiyerlerinde ve ekstrem pH ve sıcaklıklarda üreme v.b.) gibi özgül metabolik aktivite paterni ortaya konur. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırmada (taksonomi) ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. Ancak bazı mikroorganizmaların ayırımında biyokimyasal reaksiyonların kullanımı yetersizdir (62,63).

2.10.1.3.Faj tiplendirme

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini infekte ederek çoğu kez bakteri hücrelerinin erimesine neden olan viruslar olarak tanımlanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmektedirler. Faj tiplendirme yönteminin dezavantajları stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması, yöntemin zayıf tekrarlanabilirliği ve ayırım gücüdür (67,68).

2.10.1.4.Multilokus Enzim Elektroforezi (MLEE)

MLEE, enzimler iyi seçildiği zaman birçok lokus için farklı allellere sahip gen ürünleri arasında ayırıcı olabilmektedir. Bu özellik, sık tercih edilen bazı DNA parmakizi yöntemlerinde bulunmayan ve evrimsel gelişimi inceleyen araştırmacılar tarafından gereksinim duyulan bir özelliktir.

MLEE yöntemi direkt uygulanan bir yöntemdir. Hücre ekstratları, jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi veya normal koşullarda izoelektrik odaklama ile ayrılır ve enzimler spesifik boyama prosedürleri ile jellerde görünür hale getirilmektedir. İki izolat arasında bilgisayarlı değerlendirme için benzerlik katsayısının elde edilmesinde kullanılması gereken veritabanı için birkaç farklı (genellikle 6-7) metabolik enzimin (aynen MLST gibidir) değerlendirilmesi gerekmektedir (69).

2.10.2.Genotipik yöntemler

2.10.2.1. Salgın analizleri için kullanılan yöntemler

2.10.2.1.1.Kromozomal DNA'nın Makrorestriksiyon Analizi ve [("Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE)]

Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle, bu yöntem bir çok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içerisinde "altın standart" olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem, farklı yönlerden belli sürelerde verilen elektriksel akım yani "pulse" ile megabaz büyüklüklerindeki moleküller de dahil olmak üzere DNA molekülünün çözülmesi, temel prensibine dayanır (70). DNA'nın parçalanmasının engellenmesi için bakteri hücresi agaroz içerisindeyken DNA elde edilir ve ardından uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilir (16,71).

Suşların çeşidine göre farklı olan restriksiyon bölgelerine bağlı olarak, restriksiyon endonükleaz DNA'yı parçalara ayırır (16). Büyüklükleri 10-800 kb arasında değişen 5-20 DNA parçası bakterinin kromozomal restriksiyon profilini verir (16,71). Makrorestriksiyon analizinde kullanılan enzimler DNA'yı seyrek olarak keserler. Bu nedenle ortaya çıkan parçalar, klasik elektroforetik şartlarda yürütülmek için çok büyüktür. Bu DNA parçalarının göçünü sağlamak için elektrik akımının yönünün sık olarak değiştiği bir elektriksel alan sağlanır. Böylelikle DNA jel içinde ilerleyebilir (71). Belli büyüklükteki DNA molekülünün reoryantasyonunun başlamadığı bir minimum "switching time" aralığı vardır, yani küçükten büyüğe moleküllerin ayrışabilmesi için, ilk PFGE zamanları, elektroforez sırasında ardışık olarak daha yüksek bir değere çıkartılır. Bu prensip ile kısa ve/veya daha uzun "switch" zamanları kullanılarak küçük ve/veya büyük moleküllerin ayrımı sağlanmaktadır (70). PFGE özel ve pahalı bir cihaz gerektirmesi haricinde basit ve standart bir tekniktir (71). PFGE değerlendirmesi Tenover ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapılmaktadır (62). Bu yöntemle PFGE protokolleri arasında bir uyum yaratmış ve bu standart bir terminoloji haline getirilmiştir. Standart uygulama ve değerlendirme kriterlerinin bulunması, PFGE ile elde edilen sonuçların değişik laboratuvarlar arasında paylaşılmasını sağlamaktadır (71).

2.10.2.1.2. Ribotiplendirme

Genotiplendirme teknikleri epidemiyolojik çalışmalar için çok kıymetli veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Genotiplendirme amacıyla kullanılan PFGE yöntemi altın standart olmasına karşın pahalı ekipman ihtiyacı ve tecrübeli laboratuvar çalışanlarının olmasını gerektirdiğinden, aynı amaca hizmet eden daha ucuz ekipman ve tecrübeli laboratuvar çalışanlarının olmasına ihtiyaç duymayan ve de otomatize sistemlerle entegre edilebilen bir moleküler yöntem arayışları bulunmaktadır. Ribotiplendirme yöntemi ribozomal gen bölgeleri içerisindeki DNA dizilerinin değişkenliklerinin saptanması prensibine dayalı bir yöntemdir bu amaçla PZT tabanlı ribotiplendirme yöntemlerinde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin sekansının incelenmesi ya da restriksiyon enzimler ile işlenmeleri sonrası elde edilen bant farklılıklarının saptanmasına dayalı olabilmektedir (72).

Farklı ribotipleme yöntemlerinde ribozomal RNA'ların proplar yardımıyla saptadığı hibridizasyon teknikleri de kullanılabilir. Bakterilerde birçok gen tek kopya halinde bulunmaktadır, ribozomal gen bölgeleri birçok kopya halinde bulunduğundan incelenecek suşların DNA'sının izole edilmesi ve restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından

elektroforez ile DNA parçalarını ayırılması sağlanarak seçilmiş prob (rRNA'ya özgül) ile hibridize edilebilmektedir. Ribozomal genlerin bir tür içerisinde genellikle korunmuş olması, yöntemin ayırım gücünü azaltsa da, bu yöntemin bazı bakterilerin alt tiplerinin belirlenmesinde başarılı olduğu gösterilmiştir (73).

2.10.2.1.3. “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) (Arbitrarily Primed (AP PCR)

DNA parmak izi analizleri için çeşitli PZT bazlı yöntemler tanımlanmıştır (69). Bu yöntemlerden biri RAPD PZT'dir. Bu yöntemde yaklaşık 10 bazlık primerler kullanılarak bunların tutunacağı genom boyunca yerleşmiş rastgele diziler hedef alınmakta ve amplifiye edilmektedir. Çoğaltılan ürünler agaroz jelde ayrılmakta ve etidyum bromür ile boyanmaktadır. Tepkimede tek bir rasgele oligonükleotid primeri kullanıldığında, genomdaki homolog sekanslar ile hibridize olmaktadır. Eğer primer alternatif DNA ipilikçikleri üzerindeki dizilerle hibridize olursa, iki hibridizasyon bölgesi arasındaki DNA alanı amplifiye edilmektedir.

Belirli bir tür için RAPD analizi yapılması için en iyi sonuçların alındığı birçok oligonükleotid primerlerinin denenmesi gerekmektedir (74). Ayırım gücünün artırılması için birden fazla primerin kullanılması gerekmektedir. Ancak yöntemin değerlendirme kriterlerinin standart olmayışı ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması farklı laboratuvarlar arasında değil aynı zamanda aynı laboratuvar içerisinde bile sorun oluşturmaktadır. Bu nedenlerle ortak bir veri tabanının oluşturulması güçtür (71). RAPD, PFGE'den daha kolay uygulanması nedeniyle sıkça başvurulan bir yöntemdir (66). Avantaj ve dezavantajları değerlendirildiğinde RAPD, salgın araştırmasında çabuk bir ön değerlendirme yapılmak istendiğinde, daha sonra kullanılacak PFGE gibi referans yöntemler için yararlı bir ön çalışma olarak kullanılabilir (75).

2.10.2.2. Evrimsel ilişkilerin incelenmesi ve arşivleme İçin Kullanılan Yöntemler

2.10.2.2.1. *coa* (Koagülaz) Tiplendirme Yöntemi

coa tiplendirme yöntemi *S. aureus* suşlarında koagülaz enzimine ait *coa* gen bölgesinin PZT ile amplifiye edilmesinin ardından, *AluI* gibi restriksiyon enzimleri ile elde edilen kesim ürünlerinin jel elektroforezi ile aydınlatılması ve ortaya çıkan restriksiyon parçalarının büyüklük polimorfizmindeki farklarının değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır (76). Ancak bu yöntemde, restriksiyon enzimleri ile PZT ürünlerinin kesimi için uygun inkübasyon süreleri ve

sıcaklık koşullarının optimizasyonu, ayrıca elektroforez sırasında kullanılacak akım ve sürelerinin optimizasyonu gibi ön çalışmalar gereklidir (77).

2.10.2.2.2 “Multi Locus Sequence Typing” (MLST)

MLST, son yıllarda bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan yeni bir yöntemdir. Yöntem, yedi yapısal (house-keeping) gene ait kısa internal fragmanların dizi analizine dayanmaktadır (78). MLST analizi, hastalık etkeni ve antibiyotiklere dirençli bakterilerin karakterize edilmesi ve izlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir. Verilerin merkezi bir veri tabanında toplanması ve birbirleri ile bir programla karşılaştırılabildikleri için diğer yöntemlere göre daha standarttır. Verilerin web üzerinde değerlendirilebilmesi için bazı bilgisayar programları geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan “mlstdb” programı Chan ve ark. tarafından geliştirilmiştir (78). Bu programa (<http://www.mlst.net>) internet adresinden ulaşılabilir.

MLST, dizi analizi bazlı bir yöntem olup epidemiyolojik çalışmalara küresel bir yaklaşım getirmektedir. Bu yöntemde, yapısal (house-keeping) genlerden elde edilen yaklaşık 500 baz çiftlik yedi tane internal gen parçasının dizi analizi yapılmaktadır. Bu amaçla arcc,aroe,glpf,gmk,pta,tpi ve yqil genlerine ait dizi analizleri yapılmaktadır. Bakteriye her bir gen dizisi için o diziye özgü bir allel numarası verilmekte ve yedi lokuste bulunan allel numaralarının birleştirilmesi ile bir “allelık profil” oluşturulmaktadır. Benzer şekilde, bu allelik profiller de ortaya çıkarıldıkça numaralandırılmaktadır. Bu numaralar “dizi tipi (sequence type)” olarak adlandırılmaktadır. Tek bir nükleotid farklılığı bile suşun yeni bir allel numarası almasını gerektirir. Elde edilen ST (sequence type) bilgileri nümerik karakterlerden veriler olduklarından matematiksel olarak bu sekans tiplerini farklı yaklaşım yöntemleri ile yine www.mlst.net web adresinden ulaşılabilen, BURST (Based Upon Related Sequence Types), NRDB (NON-REDUNDANT DATABASES - allele assignment), LINKAGE DISEQUILIBRIUM ve SPLITS-TREE gibi on-line olarak analiz yapabilen alt filo-genetik analiz modülleri yer almaktadır (1).

MLST, infeksiyöz hastalıkların izlenmesinde uluslararası paylaşımının ve iletişimin sağlanması için ümit verici bir yöntemdir. Web sitesinde araştırmacılar bulgularını karşılaştırabilmekte ve ortak bir veri tabanı geliştirebilmektedirler. Ancak bu yöntemin yaygın olarak kullanılabilmesi, laboratuvarların dizi analizlerini ekonomik olarak uygulayabilecek teknik ekipmana sahip olmasına bağlıdır (1,35).

2.10.2.2.3. *spa* Tiplendirme

Frénay ve arkadaşları (79). *S. aureus*'un protein A (*spa*) geninin polimorfik X bölgesindeki bir tek-lokus dizi analzi yöntemi geliştirmişlerdir. *spa* tiplendirmesinin MLST'ye göre başlıca üstünlüğü daha kolay uygulanabilir oluşu ve sadece tek bir bölgenin dizi analizini gerektirmesidir. *spa* tiplendirmesinin ayırteci gücü PFGE ve MLST'nin arasında bir değerdedir. MLST'den farklı olarak, *spa* tiplendirmesi MRSA'ların hem moleküler evriminin hem de hastane salgınlarının araştırılması için uygundur. *spa* tiplendirmesinin avantajı araştırmacıların "in-house" sekanslama platformlarını kullanarak hazırlanmış yazılım programlarıyla sonuçlarını değerlendirebilmesidir.

Koreen ve arkadaşları (80) ve Harmsen ve arkadaşları (81) tarafından *spa* tiplendirme için tüm dünyada kullanılan iki farklı terminoloji sistemi tanımlanmıştır. Maalesef her iki çalışmacının terminoloji sistemindeki farklılıklar yayınlanan *spa* tiplendirmesi verilerinin karşılaştırmasını güçleştirmektedir. Bugüne kadar Ridom StaphType software (Ridom GmbH, Wurzburg, Germany) Avrupa'da *spa* sekanslarının analizinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Laboratuardaki tiplendirme sonuçları internet yolu ile merkezi *spa* serveri ile senkronize bir şekilde karşılaştırılmaktadır (<http://www.spaserver.ridom.de>). Bu web sitesi European SeqNet.org tarafından başlatılan evrensel bir terminolojiye sahip olmak üzere geliştirilmiş bir veritabanıdır. Bu veritabanı Avrupa'nın 36 farklı ülkesinde izole edilmiş 13000'den fazla izolata ait 100 farklı *spa* tekrarının kombinasyonundan oluşan 1200'den fazla *spa* tipi içermektedir. Bu yüzden *S. aureus*'la ilgili en geniş sekans bazlı veritabanıdır. *spa* tiplerine ait bilgilerin bir arada toplanmasının enfeksiyon kontrolünün devamlılığını sağlamak ve elektronik ortamda erken uyarı sistemi oluşturarak MRSA suşlarının hastane düzeyinde yaygınlığını belirlemek gibi avantajları vardır (1).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.İzolatlar

Çalışmamızda 2005-2007 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarına, yatan hastaların ve poliklinik hastalarının, kan kültürü, yara yeri ve solunum yolu örneklerinden üretilen, toplam 299 adet *S. aureus* suşu alındı.

Tablo 3: *S. aureus* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Klinik	Sayı
Reanimasyon Ünitesi	32
Ortopedi	12
Dahiliye	17
İnfeksiyon Hastalıkları	5
Dermatoloji	11
Genel Cerrahi	12
Plastik Cerrahi Servis	5
Kalp Damar Cerrahisi	2
Kulak Burun Boğaz	2
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	128
Kadın Hastalıkları ve Doğum	8
Kardiyoloji	3
Nöroşirurji	2
Nöroloji	3
Acil	34
Yeni Doğan	4
Transplantasyon Ünitesi	5
Onkoloji	6
Göğüs Hastalıkları	5
Hematoloji	1
Özel Hasta Katı	2
Toplam	299

İzolatların belirlenen hastanelerde CLSI önerilerine göre uygulanan duyarlılık testlerine göre 99 tanesi MRSA, 200 tanesi MSSA idi (82).

İzolatların üretildikleri örneklere göre dağılımı Tablo 3'te, üretildikleri kliniklere göre dağılımları ise Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4: Yatan hastalardan ve poliklinik hastalardan gönderilen klinik örneklerin dağılımı

Materyal cinsi	Sayı
Yara-abse	106
Kan ve dolaşım yolu örnekleri	141
Solunum yolu örnekleri	29
Steril vucut sıvıları	8
Burun sürüntüsü	5
İdrar	10
Toplam	299

İzolatların kliniklere göre dağılımı Tablo 4'de görüldüğü gibidir.

Gönderilen ve klinik laboratuvarında stoklanan izolatlar kanlı agar besiyerine çekilerek canlandırıldı. Kontamine kültürlerden tekrar pasaj yapıldı. İzolatlar canlandırıldıktan sonra *S. aureus* üremesinin doğrulanması amacıyla Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri uygulandı.

3.2. Multipleks Polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile PVL Varlığının Araştırılması

3.2.1 *Staphylococcus aureus* Kolonilerinden DNA eldesi

Kanlı agarda üretilen tüm klinik suşlardan akromopeptidaz yöntemi kullanılarak bakteri DNA'sı elde edildi ve multipleks PZT için kullanıldı (5,16,17)

3.2.1.1. Akromopeptidaz Yöntemi

Kullanılan Çözeltiler

Akromopeptidaz (Sigma A 3547): 10 U/µl olacak şekilde sulandırıldı. Çözelti -20°C’de saklandı.

NET tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris. Oda sıcaklığında saklandı.

Yöntem

100 µl net tamponu, 10 µl akromopeptidaz çözeltisi (10 U/µl) ile mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Steril plastik öze ile iki-üç stafilokok kolonisi alınıp tüpteki çözelti içine süspanse edildi. Tüpler 50°C’ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına gelen karışım PZT için kullanıldı.

3.2.2. *pvl/nuc* Multipleks PZT Uygulaması

Lina ve ark. (5) ve Kobayashi ve ark. (65) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Bu yöntemle *S. aureus*’ a özgü *nucA* ve *pvl* geni (*luk-PV*) varlığı saptandı.

3.2.2.1. Multipleks PZT için kullanılan Malzemeler

Tamponlar:

0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0): 186.12 g disodyum etilen di amin tetra asetat (-2H₂O) 800 ml su içinde karıştırılarak eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH 8.0’e ayarlandı. Hacim bir litreye su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

10X TBE: 108 g Tris (Applichem A 2264), 55g borik asit (Sigma B 6768), 900 ml su içinde çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5135) (pH 8.0) eklendi ve hacim bir litreye su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

TE Buffer (pH 8.0):10mM Tris (Applichem A 2264), 1mM EDTA (Sigma E 5134) (pH 8.0), 2.5ml Tris, 0.25 ml EDTA, 247.25 ml su ile karıştırıldı. pH 8.0’e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Jel Yükleme Tamponu(6X):

% 0.25 bromfenol mavisi (Sigma B 5525 - %10'luk stok)	0.75 ml
% 0.25 xylene cyanol FF (Sigma X 4126 - % 5'lik stok)	1.5 ml
%30 gliserol (su içindeki karışım)	9 ml
Distile su	18.75 ml

Diğer Malzemeler:

Etidyum Bromid (1000X, 5mg/ml):

Etidyum Bromid (Sigma E 8751)	0.5 g
Distile su	100ml

dNTP Karışımı (Fermantas 100mM): 10 µl dATP, 10 µl dGTP, 10 µl dTTP, 10 µl dCTP, 160 µl steril deiyonize su içine karıştırıldı. dNTP karışım son dilüsyon her birinden 200 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.2.2.2. *pvl/nuc* Multipleks PZT için kullanılan öncüller

Çalışmada kullanılan öncül dizileri ve stok konsantrasyonları Tablo 5'te gösterilmiştir. Öncül konsantrasyonları *nuc* ve *pvl* için 50 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı. Öncül çözeltileri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp, -20°C'de saklandı.

Tablo 5: *pvl/nuc* Multipleks PZT için kullanılan öncüller (5,65)

Öncüller	Öncül dizgileri(5'- 3')	Öncül Konsantrasyonu (stok)
nuc-1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	50 pmol/μl
nuc-2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	50 pmol/μl
luk-PV-1	ATCATTAGGTAATAATGTCTGGACATGATCCA	50 pmol/μl
luk-PV-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC (S=G,C)	50 pmol/μl

3.2.2.3. *pvl/nuc* Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon için 25 mM MgCl₂'den 5μl, 100 μM dNTP'den 5μl, 2.5 ünite *Taq* polimeraz enziminden 0.55μl, 50 pmol *nuc1* öncülünden 1 μl, 50 pmol *nuc2* öncülünden 1 μl, 50 pmol *luk-PV-1* öncülünden 1 μl, 50 pmol *luk-PV-2* öncülünden 1 μl, 10X *Taq* buffer (konsantrasyonu 1X'e düşecek şekilde), kalıp DNA (test edilecek DNA örneklerinden beş μl) toplam hacim 50 μl olacak şekilde karışım 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde hazırlandı (5,65).

3.2.2.4. *pvl/nuc* Multipleks PZT Thermal Cycler Programı

95°C	? dakika	öndenatürasyon	} 30 siklus
94°C	30 saniye	denatürasyon	
55°C	30 saniye	birleşme	
72 °C	1 dakika	uzama	
70°C	? dakika	son uzama	
+4°C	∞		

3.2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi

TBE tamponuna (1X) (50ml Tris-borik asit-EDTA; pH: 8) 0.75 gram agaroz eklenerek % 1.5 luk 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 3 µl eklendi. Karışım tarakları hazırlanmış jel kalıbına döküldü. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak jel tankına yerleştirildi. İki µl 6x jel yükleme tamponu (%0.25 brom fenol mavisi'nden 0.75 ml, %0.25 xylen cyanol FF'den 1.5 ml, %30 gliserol'ün su içindeki karışımından 9 ml, distile su'dan 18.75 ml içerir) ve 10 µl PZT ürünü karıştırılarak her bir kuyucuğa 11,8 µl yüklendi. Jel, 1XTBE buffer tamponu içerisinde 120 V uygulanarak 45 dakika yürütüldü ve sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi. Ardından görüntüldü.

luk-PV için, 433 baz çiftlik (bp), *nuc* için 280 bp ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi (5,65).

3.3. 16S/mec/nuc Multipleks Polimeraz zincir tepkimesi (PZT)

Bu amaçla Louie ve ark. tarafından önerilen yöntem uygulandı (83). Bu yöntemle *S. aureus*'a özgü *nucA*, metisilin direnç geni *mecA* ve DNA eldesi için internal kontrol olarak 16S rRNA saptanmaktadır.

3.2.1.'de anlatıldığı gibi DNA elde edildikten sonra metisilin direncinin saptanması için 16S/mec/nuc Multipleks PZT uygulandı.

3.3.1. 16S/mec/nuc Multipleks PZT İçin Kullanılan Öncüller

Çalışmada kullanılan öncül dizileri ve stok konsantrasyonları Tablo 6'da gösterilmiştir. Öncül konsantrasyonları 16 S rRNA ve *nuc* için 50 pmol/µl *mecA1* öncülü için 32 pmol/µl, *mecA2* öncülü için 27.4 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı. Öncül çözeltileri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp, -20°C'de saklandı.

Tablo 6: Multipleks PZT’de kullanılan öncüller (83).

Öncüller	Öncül dizgileri(5’- 3’)	Öncül Konsantrasyonu (stok)
16S-rRNA (F)	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	130 pmol/μl
16S-rRNA (R)	GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT	144 pmol/μl
<i>mecA-1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	137 pmol/μl
<i>mecA-2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	160 pmol/μl
<i>nuc-1</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	146 pmol/μl
<i>nuc-2</i>	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	131 pmol/μl

3.3.2. 16S/*mec*/*nuc* Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon için 3 mM MgCl₂, 200 mM dNTP, 2.5 ünite *Taq* polimeraz enzimi, 25 pmol *nuc1* öncülü, 25 pmol *nuc2* öncülü, 25 pmol 16 S rRNA forward öncülü, 25 pmol 16S rRNA reverse öncülü, 54.8 pmol *mecA1* öncülü, 64 pmol *mecA2* öncülü, 10X buffer (konsantrasyonu 1X’e düşecek şekilde), kalıp DNA (test edilecek DNA örneklerinden iki μl) toplam hacim 25 μl olacak şekilde karışım 0.5ml’lik mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde hazırlandı (83).

3.3.3. 16S/*mec*/*nuc* Multipleks PZT Thermal Cyclus Programı

94°C	2 dakika	öndenatürasyon	
94°C	30 saniye	denatürasyon	} 25 siklus
52°C	30 saniye	birleşme	
72 °C	1 dakika	uzama	
72°C	5 dakika	son uzama	
+4°C	∞		

3.3.4 Sonuçların Değerlendirilmesi

TBE tamponu (1X) içinde % 2 lik 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 2.5 µl eklendi. Karışım jel kalıbına döküldü. İki µl yükleme tamponu ile 10 µl PZT ürünü mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı. DNA ladder (100 bp) ve ürünler jel kuyucuklarına aktarıldı.

Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Jel bu tank içinde 120 V da 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ardından sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi.

16S rRNA için, 798 baz çiftlik (bp), *nuc* için 270 bp ve *mecA* için 533 bp ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi (83).

3.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi Uygulaması

Bannerman ve ark. (84) ve Leonard ve ark. (85) tarafından önerildiği şekilde İskoç MRSA Referans Laboratuvarı tarafından hazırlanmış PFGE protokolü uygulandı. Bu protokol kısaca aşığıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

Yöntem:

NET Tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris. Oda sıcaklığında saklandı.

Lizis Tamponu: 6mM Tris-HCl, M NaCl, 100mM EDTA, % 0.5 Brij 58, % 0.2 de oksikolat, % 0.5 N-Lauroyl sarcosine pH 7.6 olacak şekilde hazırlandı steril edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

Restriksiyon Enzimi Karışımı: Her bir izolat için 87 µl de iyonize su, 10 µl 10X reaksiyon tamponu, 3 µl (10 U/ µl) *SmaI* makrorestriksiyon enzimi ilave edilerek reaksiyon karışımı taze olarak hazırlandı.

1. PFGE alışma cetvelindeki suşlara göre 1.5ml'lik steril mikrosantrifüj tüpleri numaralandırıldı.
2. Her tüpe 250µl NET tamponu (akromopeptidaz ile DNA eldesinde formülü verilmiştir) konuldu.

3. Steril plastik bir öze ile, bir öze dolusu bakteri kolonisi uygun mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve NET tamponu içerisinde süspanse edildi.

4. Blok kalıpları yapışkan bantlarla kapatıldı, böylece kullanıma hazır hale getirildi.

5. Mikrosantrifüj tüplerine 20 µl akromopeptidaz ve 250 µl SeaPlaque agaroz eklendi, çok yavaş olarak içerik karıştırıldı.

6. Her suştan 2 adet olacak şekilde agaroz kalıplarında bloklar hazırlandı.

7. Agaroz katılaşmaya bırakıldı.

8. Plastik test tüplerine 0.5 ml önceden ısıtılmış lizis tamponu karıştırıldı ve her suş için bir tüp ve 2 blok olacak şekilde bloklar lizis tamponu içerisine aktarıldı.

9. Tüpler su banyosunda 1 saat tutuldu.

10. Lizis tamponu plastik pastör pipetleri ile uzaklaştırıldı.

11. Her seferinde 2ml TE tamponu ekleyerek ve tampon eklendikten sonra 10 dakika bekleyerek bloklar 3 kez yıkandı.

12. Yeni 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri suş başına bir tüp olacak şekilde numaralandırıldı.

13. Restriksiyon enzimi ile kesim için steril konik tabanlı bir tüp içinde restriksiyon enzim karışımı hazırlandı [1305µl su (deiyonize); 150µl 10x enzim tamponu, 45µl *SmaI* enzimi (100U/µl'lik stoktan) şeklinde hazırlanan karışım 15 suşun çalışılması için gereken miktardır.]

Bu aşamada steril malzeme ve filtreli pipet uçları kullanıldı.

14. Yukarıdaki karışımdan her mikrosantrifüj tüpüne 100µl eklendi.

Yıkama işleminden geçirilmiş bloklardan uygun büyüklükte kesilen parçalar karışım içerisine aktarıldı

15. Tüpler 30°C'de 3 saat su banyosunda tutuldu.

16. Blokların aktarılacağı jel yüklenmeden 1 saat önce hazırlandı.

Bu arada, CHEF DRIII cihazına tampon konuldu ve motor çalıştırılarak tamponun soğuması

sağlandı.

17. *SmaI* ile kesilmiş blok parçaları jele yüklendi ve bu kuyucukların ağzı blokların kuyucuklardan çıkmasını engellemek amacıyla %1'lik agaroz ile kapatıldı.

Yürütme şartları:

Isı: 14°C

Yürütme zamanı: 23 saat

İlk sinyal (initial switch time): 6.8 sn

Son sinyal (final switch time): 63.8 sn

Volt/cm- 6.0

18. Yürütme işleminden sonra jel etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi.

3.5. Jelin boyanması ve görüntülenmesi

Etidyum bromür stok solüsyonundan (10mg/ml) 40 µl alınarak 400 ml distile su içine eklenerek son hacim 1 µl/ml olacak şekilde boyama solüsyonu hazırlandı. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel boyama solüsyonu içine dikkatlice konularak 1/2 saat boyamaya bırakıldı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel solüsyondan çıkarılarak distile su ile yıkandı ve görüntülendi. Boyama ve yıkama işlemini takiben jel görüntülendi. Bunun için görüntüleme cihazının bağlı bulunduğu bilgisayar ve kamera açıldı. Jel translüminatörün üstüne yerleştirilerek beyaz ışıkla görüntü ayarlandı. Sonra beyaz ışıkla görüntü ayarlandı beyaz ışık kapatılarak translüminatör açıldı ve etkin ışık süresi (exposure time) 0,08 saniyeye, kamera objektifi ise kamera açıklığı 1,5, makro açıklık 30 olacak şekilde ayarlanıp görüntü elde edildi. Görüntüleme işlemi Infinity capt yazılım programı kullanılarak uygulandı.

3.6. PFGE paternlerinin değerlendirilmesi

Çalışmamız sonucunda elde edilen makrorestriksiyon analizi sonuçları Tenover kriterlerine göre değerlendirildi (62).

1) Bantlar arasında fark yoksa (hepsi aynı ise) yakın ilişkili izolatlar identik (aynı suş)

2) 1-3 bantın fark gösteriyorsa çok yakın ilişkili izolatlar

3) 4-6 bant fark olması olasılıkla ilişkili izolatlar

4) Bant farklılıklarının 7'den fazla olması farklı suşlar olarak değerlendirildi(62).

Buna ek olarak her izolat için bant sayı ve büyüklükleri belirlendikten sonra Jacards katsayısı ($J = \frac{n_{AB}}{n_{AB} + a + b}$ (n_{AB} : Hem A hem B sırasında ortak olan bantların sayısı; a: A sırasında olup B'de bulunmayan bant sayısı; b: B sırasında olup A'da bulunmayan bant sayısı). hesaplandı. Jacards katsayısı 1 olan suşlar birbirinin aynı, 0.8-1.0 olan suşlar birbiriyle ilişkili, <0.8'en küçük olan suşlar birbirinden farklı olarak değerlendirildi. Bu sonuçlar Mega Veriyon 3.1 bilgisayar programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle analiz edildi. Analizin sonucu dendogram formatında çizildi.

4. BULGULAR:

4.1. Klinik İzolatların Multipleks PZT (*nucA/ pvl*) Sonuçları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen 299 *S. aureus* suşunun tamamında *nucA* ve *pvl* genlerinin varlığı multipleks PZT yöntemi ile araştırılmıştır. İzolatların 106'sı (29 MRSA, 77 MSSA) yara ve abse; 141'i (42 MRSA, 94 MSSA) kan ve dolaşım yolu; 29'u (17 MRSA, 12 MSSA) solunum yolu, 8'i (3 MRSA, 5 MSSA) burun ve boğaz sürüntüsü ve 10'u (2 MRSA, 8 MSSA) idrar örneklerinden üretilmiştir (Tablo 7).

Akromopeptidaz yöntemi kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılan izolatların multipleks PZT sonuçlarında, 11 izolat (10 MSSA, 1 MRSA) PVL-pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 6).

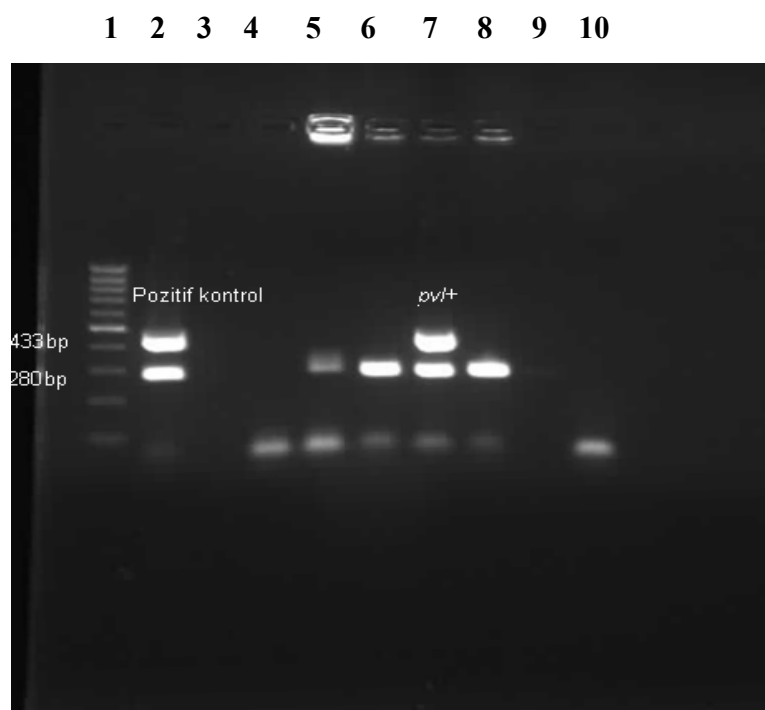
Çalışmamıza alınan 299 *S. aureus* suşundan 106'sı (29 MRSA, 77 MSSA) yara ve abse örneklerinden, 141'i (47 MRSA, 94 MSSA) kan ve dolaşım yolu, 29'u (17 MRSA, 12 MSSA) solunum yolu, 8'i (3 MRSA, 5 MSSA) steril vucut sıvılarından, 5'i (1 MRSA, 4 MSSA) burun ve boğaz sürüntülerinden ve 10'u (2 MRSA, 8 MSSA) idrar örneklerinden soyutlanmıştır.

Çalışmamıza alınan *S. aureus* suşlarının izole edildiği örnek tipleri ve MRSA ve MSSA olmalarına göre *nuc/pvl* multipleks PZT sonuçları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: İzolatların örnek tipleri ile MRSA ve MSSA olanlarının PVL pozitiflik dağılımları

Örnek tipi	MRSA		MSSA	
	PVL +	PVL -	PVL +	PVL -
Yara-abse	-	29	9	68
Kan ve dolaşım yolu	1	46	1	93
Solunum yolu	-	17	-	12
Steril vucut sıvıları	-	3	-	5
Burun ve boğaz sürüntüsü	-	1	-	4
İdrar	-	2	-	8
Toplam	1	98	10	190

Örnek olarak PVL-pozitif ve PVL-negatif bulunan izolatlardan dördüne ait multipleks PZT jel görüntüleri Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait multipleks PZT sonuçları örnekler

1.DNA ladder, 2. Pozitif kontrol (ATCC 49775),3. Boş 4. Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922), 5. PVL-negatif *S. aureus*, 6. PVL-negatif *S. aureus*, 7. PVL-pozitif *S. aureus* (H825) 8 PVL-negatif *S. aureus*, 9. Boş, 10. Negatif kontrol

Çalışmamızda, PVL pozitiflik oranı % 3.67 (11/299) olarak saptanmıştır. MRSA izolatları arasındaki PVL pozitiflik oranı %1 (1/99), MSSA izolatları arasındaki PVL pozitiflik oranı ise %5 (10/200)'tir. PVL-pozitif tek MRSA izolatı Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden gelen bir kan örneğinden üretilmiş ve 16SrRNA/*mec/nuc* PZT ile saptanmıştır.

PVL-pozitif MSSA izolatlarının merkezlere göre dağılımı; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi'nden 6 izolat, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nden 3 izolat, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 1 izolat şeklindedir.

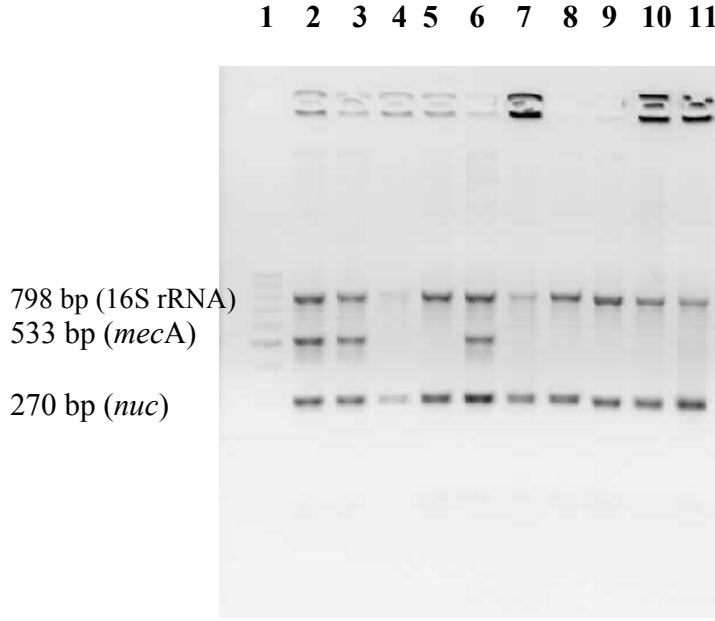
Farklı merkezlerin MSSA suş sayısına göre PVL pozitifliği oranları; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde %10 (6/59), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nde MSSA için % 4.8 (3/62), İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde %1.26 (1/79) olarak belirtilmiştir. Hacettepe Üniversitesi MRSA izolatları için oran % 2.5 (1/40)'dir. Buna göre çalışmamızda araştırdığımız Panton-Valentin lökositidin (PVL)'in, farklı merkezlerden toplanan MSSA ve MRSA izolatlarındaki oranları sırasıyla % 1.25-10 ve % 0-2

olarak bulunmuştur.

PVL-pozitif izolatların % 18'i (2/11) kandan (1 MSSA, 1MRSA), % 82'si (9/11) yara kültürlerinden izole edilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi PVL-pozitif izolatlarının kliniklere göre dağılımı % 50'si (3/6) Kadın Hastalıkları ve Doğum, % 16.6'sı (1/6) Kulak Burun Boğaz, % 16.6'sı (1/6) Beyin Cerrahisi ve % 16.6'sı (1/6) Plastik Cerrahi servislerindedir.

4.2. PVL-pozitif izolatların 16SrRNA/*mec/nuc* PZT sonuçları

Çalışmamızda seçilen 299 *S. aureus* izolatı *nucA* ve *pvl* genlerinin varlığı multipleks PZT yöntemi ile incelenendiğinde PVL-pozitif olarak saptanan 11 izolatın rutin duyarlılık yöntemleri ile elde edilen verilere göre MSSA olduğu sonucu elde edilmiş fakat rutin duyarlılık testlerinde metisiline heterorezistan direnç gösteren izolatlar olup olmadığını belirlemek için PVL-pozitif izolatların tümüne 16S/*mec/nuc* multipleks PZT uygulanmış ve metisilin direnci değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nden MSSA olarak gönderilmiş bir izolatın *mec* geni taşıdığı yani MRSA olduğu saptanmıştır (Şekil 7).

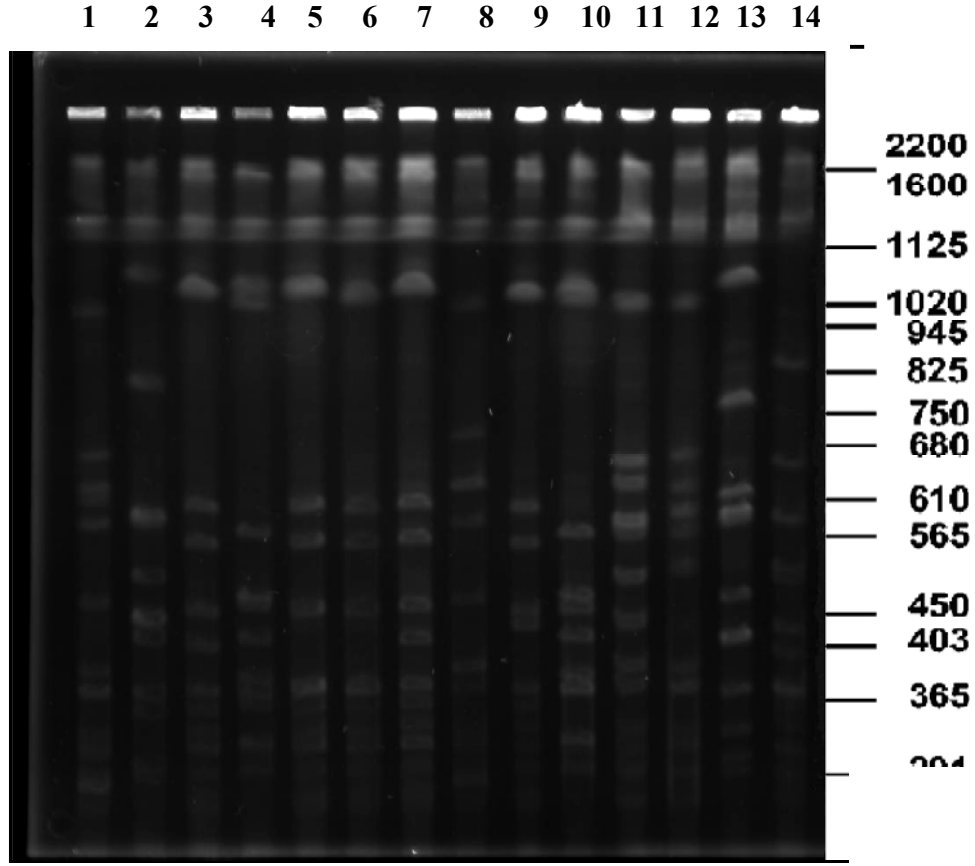


Şekil 7: PVL-pozitif izolatların mec-nuc PZT sonuçları

1. DNA ladder, 2. Pozitif kontrol (EMRSA-2), 3. Pozitif kontrol (EMRSA-6), 4. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (H012), 5. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (H030), 6. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatı (H825), 7. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (H576), 8. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (D.E.672), 9. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (D.E.709), 10. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (D.E.763), 11. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatı (D.E.813), 12. Boş, 13. Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922)

4.3. PVL-pozitif izolatlara uygulanan PFGE'nin Sonuçları

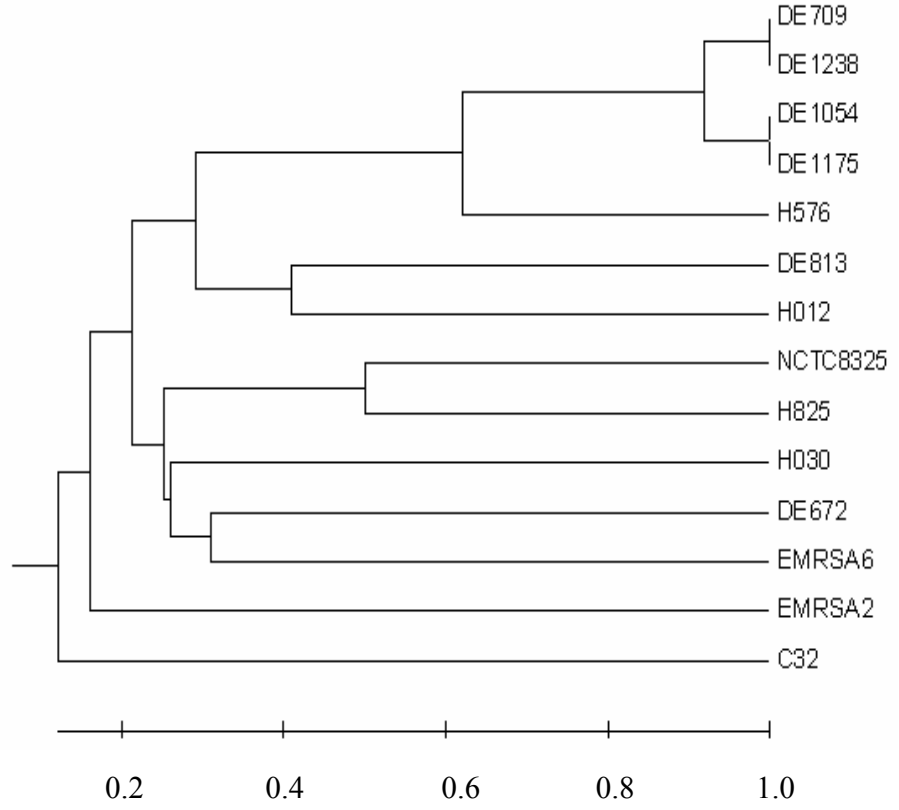
PVL-pozitif saptanan 11 izolat epidemiyolojik olarak "altın standart" metod olarak kabul edilen pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile değerlendirilmiştir. Buna göre; Dokuz Eylül Üniversitesi izolatlarının dördü birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri ikili gruplar halinde birbirleri ile identiktir. Her iki grup arasında da bir bant fark bulunmaktadır. İdentik izolatlardan ikisi iki aylık bir süre içerisinde farklı servislerden izole edilmiştir. Hacettepe Üniversitesi izolatlarından birinin makrorestriksiyon paterni de bu gruplar ile benzerdir. Diğer izolatlar tamamen farklı suşlar olarak değerlendirilmiştir. PVL pozitifliği saptanan 11 izolata uygulanan PFGE ile elde edilen jel görüntüleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8: Çalışmamızdaki PVL-pozitif saptanan tüm izolatların PFGE görüntüleri

1.E-MRSA-2 (kontrol), 2.Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/D.E. 672), 3. Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/D.E. 709.), 4.Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/D.E. 813.), 5.Metisiline duyarlı *S. aureus* (doku izolatı/D.E.1054.), 6. Metisiline duyarlı *S. aureus* (doku izolatı/D.E. 1175.), 7.Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/D.E. 1238.), 8.E-MRSA-6 (kontrol), 9.Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/H. 576.), 10.Metisiline duyarlı *S. aureus* (göz izolatı/H. 012.), 11.NCTC 8325 (kontrol), 12.Metisiline dirençli *S. aureus* (kan izolatı/H. 825.), 13.Metisiline duyarlı *S. aureus* (yara izolatı/H. 030.), 14.Metisiline duyarlı *S. aureus* (kan izolatı/C. 32), 15.Saccharomyces *cerevisiae* (marker)

Makrorestriksiyon analizine göre; Dokuz Eylül Üniversitesi suşlarından DE 709 ve DE 1238 numaralı suşlar birbiri ile identik olup yine Dokuz Eylül Üniversitesi suşlarından birbiriyle identik olarak bulunan DE 1054 ve DE 1175 numaralı suşlar ile yakın ilişkili olarak saptanmıştır. Ayrıca Hacettepe Üniversitesi izolatlarından H 576 numaralı suş bu birbiriyle identik Dokuz Eylül Üniversitesi suşları ile benzer bulunmuştur. UPGMA yöntemiyle çizilen dendogram Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9: PVL-pozitif *Staphylococcus aureus* suşları ile Kontrol (EMRSA-2, EMRSA-6, NCTC8325) suşlarının makrorestriksiyon analizi sonucu elde edilen Jakards katsayıları kullanılarak ve Mega Version 3.1 bilgisayar programında UPGMA yöntemi kullanılarak oluşturulan dendrogram

5. TARTIŞMA

Deri infeksiyonlarından septisemiye kadar pek çok infeksiyona yol açabilen bir patojen olan *S. aureus* patogeneğinde önemli birçok virulans faktörü içermektedir (86). Bu virulans faktörlerinden biri doku harabiyetini arttıran bir sitotoksin olan Panton-Valentin Lökosidin'dir (87). Bu önemli virulans faktörüne genellikle toplum kökenli MRSA suşlarında rastlanmaktadır (39). Pek çok çalışmada *pvl* genine sahip olan *S. aureus* suşlarının genel sıklığının % 5'in altında olduğu belirtilmektedir (4,5). Ancak PVL pozitifliğinin *S. aureus* infeksiyonunun izole edildiği odakla ilişkisi incelendiğinde, bu oranın özellikle nekrotizan deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve fronküllerinden izole edilen suşlarda arttığı saptanmıştır (88,89).

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Ocak 2005- Mayıs 2006 tarihleri arasında kan, yara, solunum yolu örneklerinden rasgele seçilerek üretilmiş 55 MRSA ve 79 MSSA suşunda PVL varlığı araştırılmıştır. Hem *pvl (luk)* hem de *S. aureus* için özgül *nuc* genlerinin saptandığı multiplex PZT yöntemi ile değerlendirilen izolatlardan 2005 yılına ait 40 MSSA suşunun ikisinde (% 5) ve 2006 yılına ait 39 MSSA suşunun dördünde (% 10.3) PVL varlığı saptanmıştır. Bu çalışmada MRSA izolatlarında PVL saptanmamıştır. Bu sitotoksin MSSA izolatlarında da yaygın olmamakla birlikte, 2006 yılındaki prevalansın 2005 izolatlarına kıyasla iki kat fazla olması ve PVL-pozitif izolatların dördünün Genel Cerrahi servis veya polikliniğindeki hastalardan izole edilmiş olması dikkat çekicidir (6).

Chini ve arkadaşlarının (90) Yunanistan'da *S. aureus* izolatlarında *pvl* geninin dağılımını araştırdıkları çok merkezli (Yunanistan'da 3 hastanede) çalışmada, 1058 *S. aureus* izolatının % 27'sinin (n=287) PVL-pozitif olduğunu; bunlardan % 45'inin (n=222) MRSA ve % 12'sinin (n=65) de MSSA olduğunu bildirilmiştir. PVL-pozitif MRSA izolatlarının çoğunun (n=157) CA-MRSA olduğunu rapor etmişlerdir.

Wannet ve arkadaşları (91) Hollanda'da 1987-1995 yılları arasında izole ettikleri 216 MRSA izolatında % 1 (2/216), 2000 yılı MRSA izolatlarında % 5 (5/99), 2002 yılı MRSA izolatlarında ise %15 (15/98) oranlarında PVL pozitiflik saptamışlardır. Bu çalışmada izolatların infeksiyon odakları bildirilmemekle birlikte 2000-2002 yılları MRSA izolatlarının SCCmec tipleri incelenmiş ve % 80'inin (16/20) SCCmec tip-IV taşıdıkları saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada PVL pozitiflik oranlarının her geçen yıl arttığı da görülmektedir.

Diep ve arkadaşlarının (4) yaptıkları çalışmaya göre; 1999-2000 yılları arasında izole edilen MRSA suşlarının % 36'sı (37/101) PVL-pozitif olarak saptanmış, 2002 yılı MRSA izolatlarının % 35'i (29/82) ve 1997-2002 yılları arasında izole edilen MRSA izolatlarının % 70'i (106/151) PVL-pozitif MRSA suşu olarak bildirilmiştir. Ancak bu çalışmaya alınan MSSA izolatlarının % 6.7'sinde (6/89) PVL pozitifliği saptanmıştır (4).

Denis ve arkadaşlarının (92). 2002-2004 yılları arasında Belçika'da izole ettikleri 41 metisiline dirençli *S. aureus* izolatını PVL pozitifliği açısından PZT ile inceledikleri çalışmada % 40'ının (16/41) PVL-pozitif olduğu saptanmıştır.

Öksüz ve arkadaşlarının MSSA ve MRSA suşlarında PVL varlığını araştırmaları ön çalışmada; PVL pozitifliği MRSA suşlarında %41, MSSA suşlarında ise %24 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada PVL-pozitif olarak saptanan toplam 18 izolatın (9 adet MRSA, 9 adet MSSA) 17 tanesi deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilmiş, MSSA olarak saptanmış bir adet PVL-pozitif suş ise idrardan izole edilmiştir (7)

Öksüz ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu ön çalışmada PVL pozitiflik oranlarının yüksek olması toplum kökenli infeksiyonlardan izole edilen suşların sayıca daha yüksek oranda olmasından kaynaklanıyor olabilir. PVL pozitiflik oranlarının yüksek olmasının bir diğer sebebi de suşların izole edildiği infeksiyon odakları içerisinde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının sayıca fazla olması olabilir. Ayrıca PVL pozitiflik oranlarının yüksek olmasının üçüncü bir sebebi de iki yıllık zaman zarfında İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi'nde değişen hasta profili olabilir.

Ülkemizde 2008 yılında *S. aureus* suşlarında PVL varlığını araştıran diğer bir çalışmada ise; çalışmaya alınan MRSA izolatlarının % 3'ü (8/261) ve MSSA izolatlarının % 9.3'ü (4/43) PVL-pozitif olarak saptanmış, bu PVL-pozitif bulunan izolatlardan 7'si yara yeri infeksiyonundan, 4'ü idrar yolu infeksiyonundan ve 1'i de eklem sıvısından soyutlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca PVL-pozitif izolatların SCCmec tipleri incelenmiş 1 izolatın HA-MRSA, diğer 11 izolatın ise CA-MRSA olduğu saptanmıştır (93).

Yapmış olduğumuz çalışmada toplam 299 *S. aureus* izolatının % 3.6'sında (n=11) PVL pozitifliği saptanırken, benzer olarak yalnızca yara ve apse örnekleri (n=97) dikkate alındığında izolatların % 9.2'si (n=9) PVL-pozitif olarak saptanmıştır.

Yıllar içerisinde antibiyotik kullanımına bağlı olarak başta hastane infeksiyonlarında ve

de toplum kökenli *S. aureus* infeksiyonlarında metisiline dirençli olan *S. aureus* suşlarının oranı artmaktadır (94). *S. aureus*'a bağlı infeksiyon hastalıklarının prognozunu önemli düzeyde etkileyen metisiline direnç özelliği ile virulans faktörlerinin birlikteliği pek çok araştırmacı tarafından ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ancak farklı coğrafi bölgelerde PVL pozitifliği birlikteliğinin MRSA ya da MSSA suşları lehinde artabildiği saptanmıştır (6,10,11). Ayrıca farklı çalışmalarda infeksiyon etkeni *S. aureus* suşlarının sahip olduğu SCCmec tipinin saptanması ile izolatların toplum kökenli mi yoksa hastane kökenli mi olduklarına göre ayrımlandığı korelasyon ilişkileri incelenmiştir (2,11).

Toplum kökenli olması ve doku nekrozuna yol açan bir *S. aureus* infeksiyonu bulunması ön koşulu ile oluşturulan hasta grupları ile sınırlanacak bir çalışmada *pvl* geni varlığının yüksek oranda saptanması beklenebilir. Yeterince geniş ölçekli ve yeterli sayıda örneğe ulaşılmadıkça, infeksiyon odaklarından yaklaşık <%5 gibi düşük oranlarda karşılaşılan bir virulans özelliğinin aynı zamanda rutin fenotipik yöntemlerle saptanan metisiline direnç özelliği ile ilişkisinin ölçülebilmesi zordur. Bunun bir sebebi rutin duyarlılık yöntemleri ile saptanan metisilin direnç paternlerinin moleküler yöntemler ile elde edilen bulgularla çelişebilmesi (95), diğer bir sebebi de toplum kökenli bir *S. aureus* suşu ile karşı karşıya olup olmadığımızı ortaya koyan SCCmec tipinin belirlenmemiş olmasıdır. Zira hastaneye yatış öyküsü ve infeksiyon odağından izole edilme zamanı gibi özelliklere dayanan “Hastane kökenli infeksiyon” ile “Toplum kökenli infeksiyon” ayrımını sağlayan kriterler ile yapılan öngörüler moleküler yöntemler ile zaman zaman örtüşmektedir (96).

Bazı çalışmalarda tek bir infeksiyon odağından izole edilen suşların metisilin direnci ve PVL pozitifliği oranları araştırılırken bazılarında ise tek bir metisilin direnç paternine ait izolatların PVL pozitiflik oranları araştırılmış ancak tüm bu çalışmalarda toplum kökenli ya da hastane kökenli oluşu dikkate alınmıştır. Örneğin; Issartel ve arkadaşlarının (97) Fransa’da 2005 yılında yaptığı bir çalışmaya göre; sadece cerrahi olarak drene edilen, etkeni toplum kökenli *S. aureus* olduğu düşünülen 95 abse örneğinden % 72 olarak soyutlanan *S. aureus* izolatının % 89’unda PVL pozitifliğine raslanmıştır (97). PVL, *S. aureus*’ta nadir rastlanan (<%5) bir toksin olması, bizim çalışmamızda olduğu gibi çalışmaya dahil edilen suşların rastgele seçilmesinden, farklı infeksiyon odaklarından alınan örneklerin çalışılmasından ve her bir farklı çalışmanın farklı kıtalardan ve farklı ülkelerden izole edilen örnekleri içermesinden kaynaklanmaktadır (97).

CA-MRSA'nın 1982 yılında ilk kez rapor edilmesinden sonra 1990'ların başında hastane risk faktörlerinden bağımsız olarak dört küçük çocuğun nekrotizan pnömoni sebebiyle ölmesi ile PVL-pozitif CA-MRSA izolatlar ile yapılan çalışmalar artmıştır (96). Günümüze değin yapılan pek çok çalışma insan polimorfonükleer hücrelerini apoptoza veya nekroza götüren PVL sitotoksininin genç ve sağlıklı insanlarda deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından ve nekrotizan pnömoniden izole edilen CA-MRSA suşlarında bulunması dikkat çekicidir (2,9,51). Ancak bazı çalışmalarda PVL'nin *S. aureus* patogenezinde rol oynadığına ilişkin büyük çelişkiler olduğu da belirtilmektedir (98). PVL'nin abse oluşturmaya doğrudan etkisini araştıran fare modeli ile yapılan çalışmada, CA-MRSA'nın deri ve yumuşak doku infeksiyonu oluşturmada doğrudan etkisinin bulunmadığı saptanmıştır. Özellikle USA300 suşunun delesyon ile PVL üretemez duruma gelmiş mutant halinin de tıpkı yabancı tipinde olduğu gibi dermonekroza yol açabildiği gösterilmiştir Ayrıca PVL üretemeyen mutant suşun yabancı tipte ayırtedilemez ölçüde fagositoz sonrası PMN'leri parçaladığı gösterilmiştir (99). Özellikle USA300 genomu por oluşturan lökotoksinlerden en az üçünü daha kodlamaktadır. Bunlar; $[\gamma]$ -hemolizin (*hlgA*, *hlgB* ve *hlgC*), LukE/D (*lukD* ve *lukE*) ve LukS/F homoloğu (*SAUSA300_1975* ve *SAUSA300_1974*) PVL alt üniteleri ile % 82'nin üstünde benzerlik göstermektedirler. Bu moleküllerin CA-MRSA patogenezindeki rolü henüz tespit edilememiştir (98).

Bu çalışmanın sonuçları tüm klinik örnekler içerisindeki PVL pozitifliği ve de farklı odaklardan izole edilen suşlar ile elde edilen PVL pozitifliği sonuçlarının diğer çalışmalarla karşılaştırılmasına imkan tanısa da SCC*mec* tiplerinin belirlenmemiş olması ile tümüyle ayrıntılı bir karşılaştırma yapılabilmesini engellemektedir.

Farklı coğrafi bölgelerde *S. aureus* infeksiyonlarının toplum kökenli ya da hastane kökenli oluşları, metisilin direnç paternleri ve de PVL pozitiflik özelliklerine göre ayrıntılı klonal ilişki düzeylerinin değişebilen dağılımların ortaya konulabilmesi için, halihazırda yapılmış olan derlemeler yerine kanıt değeri daha yüksek olan sistematik derlemeler ve meta-analizlere ihtiyaç vardır. [8,100].

Klonal ilişkilerin araştırılmasında, makrorestriksiyon paternlerinin incelenmesini sağlayan pulsed-field jel elektroforezi yöntemi altın standart olarak kabul görmektedir (12). Yapılan pek çok çalışmada infeksiyon hastalıklarından sorumlu olan bakterilerin plazmit, transpozon ve bakteriofalar ile taşınan antibiyotik direnç genlerini kazandıkça kromozomal virulans

özelliklerinin azaldığı saptanmıştır (101). Ancak Metisilin direncinden sorumlu bulunan *mecA* geninin kromozomal olarak taşınıyor olması ayrıca *pvl* geninin *S. aureus* için yapısal değil de bakteriyofaj ile sonradan kazandığı bir virulans özelliği olması, genetik baskının yönünü öngörülebilmesini güçleştirmektedir.

Özet olarak Stafilokok infeksiyonlarında artan önemi olan PVL'nin metisiline duyarlı ve dirençli gruplardaki sıklığı ve klonal ilişkilerini ortaya koymak amacıyla PZT ile *pvl* varlığı araştırılmış ve 299 izolat içerisinde yalnızca 1 MRSA suşunda ve 10 adet MSSA suşunda *pvl* geni varlığı saptanmıştır. Rutin izolasyon yöntemlerinde koagülaz testi ile belirlenen bu suşların identifikasyonlarını doğrulamak amacıyla *nuc* geninin varlığı ayrı bir moleküler yöntem olarak değil, daha ekonomik olan ve aynı zamanda *pvl* geni varlığını da araştıran tek bir multipleks PZT reaksiyonu ile saptanmaya çalışılmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen 6 adet PVL-pozitif MSSA'nın 4 tanesinin klonal olarak birbirleriyle yakın ilişkili olması ve bu 4 izolatın 2'şerli olarak birbirleriyle identik olmaları PVL-pozitif suşların yayılma potansiyelinin bir göstergesi olabilir. Farklı coğrafi bölgelerde hakim olan *S. aureus* klonunun özelliğine göre bazen toplum kökenli MRSA suşlarında bazen de MSSA suşlarında PVL pozitiflik oranları yüksek saptanmaktadır. Bu çalışmada PVL pozitiflik oranı MRSA'larda % 1, MSSA'larda ise % 5 olarak saptanmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

PVL, lökosit ve makrofajlar üzerindeki litik etkisi ve fagositozu engellemesi nedeniyle *S. aureus*'un virulansında önem taşımaktadır. *S. aureus*'un toplum kökenli pnömonilerin yaklaşık % 2'sinden ve hastane kaynaklı pnömonilerin en az % 10'undan sorumlu olması, *S. aureus* suşlarının sağlıklı çocuklarda ve genç erişkinlerde hızlı gelişen, şiddetli hemorajik, nekrotizan pnömoniye yol açması ve yüksek oranda öldürücü etkiye sahip olması (yaklaşık % 75) ayrıca *S. aureus* pnömonisinin kardiyovasküler hastalıklar, kanser, kronik pulmoner hastalıklar ve diabetes mellitus (tip2 diabet) gibi birçok ciddi hastalığa sahip olan yaşlı kişilerde % 30-80 oranlarında ölüme yol açması, son yıllarda dikkat çekici hale gelmiştir. Bu çalışmada PZT yöntemi, ülkemizde farklı bölgelerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında *pvl* geni varlığı araştırıldı ve PVL-pozitif suşların klonal ilişkileri incelendi.

PVL üreten MRSA suşları ve çocuklardaki nekrotizan pnömoni tablosu arasında ilişki bulunması nedeniyle PVL varlığı veya yokluğu önem taşımaktadır. Gelecekte hastalık etkeni olan suşların PVL bulundurup bulundurmamalarına göre klinik tedavi yöntemleri (kemoterapötiklerin kullanılması ya da immünoterapi yöntemlerinin uygulanması gibi) geliştirilmesi mümkün olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2007 Mar;13(3):222-235.
2. Kilic 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 Microbiol. 2006 Dec;44(12):4436-4440.
3. Van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Heck ME, Wannet WJ. Transmission of a Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. J Clin Microbiol. 2005 Dec;43(12):6209-6211.
4. Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):2080-2084.
5. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999 Nov;29(5):1128-1132.
6. Özkul H, Öktem IM, Gülay Z. Investigation of the presence of panton-valentin leukocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul. 2007 Jul;41(3):357-362.
7. Öksüz L, Gürler N, Güner S, Bal Kayacan Ç. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentine lökositidin (PVL) varlığının araştırılması: Ön çalışma. Ankem Derg 2008;22 (Ek1).
8. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest. 2007 Jan;87(1):3-9.

9. Morgan M. *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine leukocidin, and necrotising pneumonia. *BMJ*. 2005 Oct 8;331(7520):793-794.
10. Roberts JC, Gulino SP, Peak KK, Luna VA, Sanderson R. Fatal necrotizing pneumonia due to a Panton-Valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2008 Feb 19;7:5.
11. Cosgrove SE, Sakulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *S. aureus* Bacteremia: a Meta Analysis. *Clin Infect Dis*, 2003;36:53-59.
12. Yamamoto T, Dohmae S, Saito K, Otsuka T, Takano T, Chiba M, Fujikawa K, Tanaka M. Molecular characteristics and in vitro susceptibility to antimicrobial agents, including the des-fluoro(6) quinolone DX-619, of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the community and hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Dec;50(12):4077-4086.
13. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19(3):512-530.
14. Walvogel FA, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Staphylococcus aureus*, Principles and Practice of Infectious Diseases. Newyork
15. Cengiz AT. *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara .1999: 339-347.
16. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram Positive Cocci. The Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co. 2006:623-671.
17. Witte W. Diagnostic, Typing and Taxonomy. Gram Positive Pathogens. American Society for Microbiology 2000. Washington, D.C.

29. Garnier F, Tristan A, François B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, Liassine N, Wannet W, Denis F, Ploy MC. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis*. 2006 Mar;12(3):498-500.
30. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002 Mar 2;359(9308):753-759
31. Jo-Ann McClure, John M. Conly, Vicky Lau, Sameer Elsayed, Thomas Louie, Wendy Hutchins, Kunyan Zhang. 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 Mar;44(3):1141-1144.
32. Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piémont Y. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*. 1995 Oct;63(10):4121-4129.
33. Hensler T, Köller M, Prévost G, Piémont Y, König W. GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Panton-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1994 Dec;62(12):5281-5289.
34. Diep B A, Otto M, The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2008 Aug;16(8):361-639.
35. Jung N, Lehmann C, Hellmann M, Seifert H, Valter MM, Hallek M, Fätkenheuer G, Kochanek M. Necrotizing pneumonia caused by Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* originating from a Bartholin's abscess. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2008;2008:491401
36. Nass, T., Fortineau N., SpicQ C, Robert J, Jarlier V, Nordmann P. 2005 Three yeas survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French university hospital. *J. Hosp. Infect*. 61:321-329.

37. Naimi T.S, LeDell KH, Como-Sabetti K, SM Borchardt., Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R. 2003. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 290:2976-2984.
38. Shulka SK, Stemper ME, Ramaswamy SV, Conradt JM, Reich R, Graviss EA, Reed KD. 2004. Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. J. Clin. Microbiol. 42:3752-3757.
39. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003 Aug;9(8):978-984.
40. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4719-4730. Erratum in: J Clin Microbiol. 2005 Dec;43(12):6223.
41. Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2004 Feb;10(2):92-97. Review.
42. Sheagren JN, Schaberg DR. Staphylococci. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998;1693-1703.
43. B Söderquist, K-G Sundqvist,* and T Vikerfors: Adhesion molecules (E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) in sera from patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia with or without endocarditis: Clin Exp Immunol. 1999 December; 118(3): 408–411
44. Holtfreter S, Bröker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005 Jan-Feb;53(1):13-27. Review.

45. Kim SH, Park WB. Outcome Of Inappropriate Initial Antimicrobial Treatment in Patients With Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia. JAC.2004; 15:458-464.
- 46.Çolak D. Antimikrobiyal ilaçlar ve Etki Mekanizmaları. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji” Ankara Güneş Kitabevi.1999:81-89.
47. Jawetz E. Penicilins and Cephalosporins .Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology .3th ed. California . Appleton and Lange 1987:516-526.
48. Shinaberger DL, Malotti KR, Murray RW, Lin AH, et all. Mechanism of Action of Oxalidinones; Effect of Linizolid Translation Reactions. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2132-2136.
49. Yao JDC, Moellering RC. Antibacterial Agents. Murray PR, Baron EJ, Phaller MA ,Tenover FC, Yolken RM .Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington ASM pres.1995:1281-1307.
50. Lundstrom TS, Sobel JD. Vancomycin, Trimetoprim-Sulfomethoxazole and Rifampin. Infect Dis Clin Nort Am 1995;9:747-767.
51. Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara .1999:91-108.
52. Rice LB.Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria.Am J Infect Control. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S11-9; discussion S64-73. Review.
53. Gülay Z. Gram pozitif bakteri infeksiyonları: direnç ve epidemiyoloji. Aknem Dergisi, Cilt 22, Sayı Ek-2, s 276-286, 2008
54. Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D et al. Reemrgence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community acquired methicillin-resistant clone Lancet 2005; 365: 1256-1258.
55. Borg MA, Kraker M, Scicluna E, van de Sande-Bruisma N et al. Prevalance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 1310-1315.

56. Sader HS, Walters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and VRE isolates in European Medical centers (2005). *BMC Infect Dis* 2007; 7: 29.
57. Bell JM, Turnidge JD. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalised patients in the Asia-Pacific region and South Africa: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 879-881.
58. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ. Survey of infections due to *Staphylococcus* spp. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (suppl2): S114-S132
59. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The Emergence And Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 486-493.
60. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of Methicillin- Resistant *S. aureus*. *Int J Med Microbiol* 2002;292: 67-74.
61. Hanssen AM, Sollid JU. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 May;51(5):1671-1677.
62. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 September; 33(9): 2233–2239.
63. Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis, In: Crossley KB, Archer GL (Eds): *The staphylococci in Human Disease*, Churchill Livingstone, Newyork, 1997, 253-283.
64. Back NA, Linnemann CC, Pfaller NA: Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin resistant *Staphylococcus aureus*: the importance of molecular epidemiology, *JAMA*, 270:1329-1336, 1993.
65. Kobayashi Y, Yoshino A. A case of inv dup (15) mosaic with mental retardation and symptomatic generalized epilepsy *No To Shinkei*. 1999 Mar;51(3):259-262.

66. Blanc DS, Petignat C, Moreillion P, Wenger A, Bile J, Francioli P. Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing, *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.*, 17:654-659, 1996.
67. Haşçelik G.: Hastane infeksiyonlarında laboratuvarın rolü, *Hast. İnfekt. Der.*, 1: 21-30, 1997.
68. Mulligan M.E., Arbeit R.D.:. Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Infect, Cont. Hosp. Epidemiol.*, 12: 20-28, 1991.
69. Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000: 332-370.
70. 2004 ASM Pres. Washington DC.-2006 Palme Yayıncılık, Ankara. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Editör: David H. Persing ve diğerleri. Bölümü yazan Richard V. Goering. Çeviri Alper Tekeli. Bölüm 15, sayfa 185-196.
71. Lefevre JC, Faucon G, Sincard AM, Gasc AM. DNA Fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(10):2724-2728.
72. Oliveira AM, Ramos MC. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Feb;35(2):175-180.
73. Derbentli Ş. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler biyolojik yöntemlerin yeri. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S (editörler). “İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler” kitabında. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 42, M.G.G. As Matbaacılık, İstanbul, 2002; s 6-13.
74. Van Belkum A, Sluijter M, de Groot R, Verbrugh H, Hermans PWM. Novel BOX-PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5): 1176-1179.
75. Doit C, Picard B, Loukii C, Geslin P, Bingen E. Molecular epidemiology survey of penicillin-susceptible and –resistant *Streptococcus pneumoniae* recovered from patients with meningitis in France. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 1971-1978.

- 76.** Rodrigues da Silva E, da Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res.* 2005 Oct;69(4):260-264.
- 77.** Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E, Hiramatsu K. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3698-3707.
- 78.** Chan M, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi-locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001; 17(11): 1077-1083.
- 79.** Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Jan;15(1):60-64.
- 80.** Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):792-799.
- 81.** Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5442-5448.
- 82.** National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement (M100- S15) NCCLS/CLSI, Wayne, Pennsylvania 2005.
- 83.** Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, et al. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococci* from Blood Culture Bottles by Using a Multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2786-2790.
- 84.** Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1995 Mar;33(3):551-555.
- 85.** Leonard RB, Mayer J, Sasser M, Woods ML, Mooney BR, Brinton BG, Newcomb-Gayman PL, Carroll KC. Comparison of MIDI Sherlock system and pulsed-field gel electrophoresis in

characterizing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak. *J Clin Microbiol.* 1995 Oct;33(10):2723-2727.

86. Nygaard TK, DeLeo FR, Voyich JM. Investigation of the presence of panton-valentin leucocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples] *Mikrobiyol Bul.* 2007 Jul;41(3):357-362

87. Ward, PD, Turner WH. 1980. Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect. Immun.* 28:393–397

88. 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 May;43(5):2384-2390.

89. Narita, S., J. Kaneko, J. Chiba, Y. Piemont, S. Jarraud, J. Etienne, and Y. Kamio. 2001. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene* 268:195–206.

90. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Jan;12(1):29-33

91. Wannet ve arkadaşlarının (Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Tiemersma E, Willems RJ, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Etienne J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leucocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3341-3345.

92. Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, Hallin M, Huysmans G, Garrino MG, Glupczynski Y, Malaviolle X, Vergison A, Struelens MJ. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Dec;56(6):1103-1106.

93. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist.* 2008 Sep;14(3):203-210

94. Jeyaratnam D, Whitty CJ, Phillips K, Liu D, Orezzi C, Ajoku U, French GL. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial. *BMJ*. 2008 Apr 26;336(7650):927-930.
95. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr;7(2):323-326. Review.
96. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2554-2563.
97. Issartel B, Tristan A, Lechevallier S, Bruyère F, Lina G, Garin B, Lacassin F, Bes M, Vandenesch F, Etienne J. Frequent carriage of Panton-Valentine leukocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3203-3207.
98. Nygaard TK, DeLeo FR, Voyich JM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: advances toward identifying the key virulence factors. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Apr;21(2):147-152. Review.
99. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis*. 2006 Dec 15;194(12):1761-1770.
100. Morgan MS. Diagnosis and treatment of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Oct;30(4):289-296. Review.
101. Seidl K, Stucki M, Ruegg M, Goerke C, Wolz C, Harris L, Berger-Bächi B, Bischoff M. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1183-1194.