

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA
PANTON-VALENTİNE LÖKOSİDİN VARLIĞININ VE KLONAL
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yücel DUMAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU

MALATYA 2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KLİNİK İZOLATLARINDA
PANTON-VALENTİNE LÖKOSİDİN VARLIĞININ VE KLONAL
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Yücel DUMAN
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU**

Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 2012/54 sayılı kararı ile Etik Kurulu Onayı almıştır. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/51 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TABLO DİZİNİ	IV
ŞEKİL DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VII
TEŞEKKÜRLER	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1. Tarihçe ve sınıflandırma	3
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Genel özellikleri	5
2.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un virülans faktörleri	6
2.1.3.1. Kapsüler Polisakkarit	6
2.1.3.2. Hücre Duvarı Yapısı	7
2.1.3.2.1. Peptidoglikan tabaka	7
2.1.3.2.2 Teikoik asit	8
2.1.3.2.3. Protein-A	9
2.1.3.3 <i>S. aureus</i> 'un enzimleri	10
2.1.3.3.1 Katalaz	10
2.1.3.3.2 Koagülaz	10
2.1.3.3.3 Stafilokinaz (Fibrinolizin)	11
2.1.3.3.4 Hiyalüronidaz	11
2.1.3.3.5 Lipaz	11
2.1.3.3.6 Deoksiribonükleaz	11
2.1.3.3.7 Beta laktamaz	11
2.1.4 <i>S. aureus</i> 'un Toksin ve Hemolizinleri	12
2.1.4.1 Eksfoliyatif toksin (Epidermolitik toksin)	12
2.1.4.2 Enterotoksin	12
2.1.4.3 Toksik şok sendrom toksin (TSST)	13
2.1.4.4 Alfa hemolizin	13

2.1.4.5 Beta hemolizin	13
2.1.4.6 Delta hemolizin	13
2.1.4.7 Bikomponent Toksinler	14
2.1.4.7.1 Gamma hemolizin	14
2.1.4.7.2 Lökotoksin LukE/LukD	14
2.1.4.7.3 Panton Valentine Lökosidin	14
2.2. <i>S. aureus</i> 'un identifikasyonu	15
2.2.1 Koloni Tiplendirme	15
2.2.2 Gram Boyama	15
2.2.3 Katalaz Testi	15
2.2.4 Koagülaz Testi	15
2.2.4.1 Bağlı Koagülaz Testi (Lam Deneyi)	15
2.2.4.2 Serbest Koagülaz Testi (Tüp Deneyi)	16
2.2.5 Deoksiribonükleaz (DNase) Testi	16
2.2.6 Thermostable endonükleaz testi	17
2.2.7 Mannitol Fermantasyonu	17
2.2.8 Basitrasine duyarlılık testi	17
2.3 <i>S. aureus</i> 'un Klinik Enfeksiyonları	17
2.3.1 Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	18
2.3.2 Sistemik Enfeksiyonlar	19
2.3.2.1 Kemik ve Eklem Enfeksiyonları	19
2.3.2.2 Solunum Sistemi Enfeksiyonları	19
2.3.2.3 Endokardit	19
2.3.2.4 Bakteriyemi	20
2.3.2.5 Menejit	20
2.3.3 Toksinlere Bağlı Olarak Gelişen Enfeksiyonlar	20
2.3.3.1 Stafilokokal Besin Zehirlenmesi	20
2.3.3.2 Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu	20
2.3.3.3 Toksik Şok Sendromu (TSS)	21
2.4. <i>S. aureus</i> 'larda Metisilin Direnci	21
2.5 Epidemiyoloji ve korunma	22
2.6 Panton Valentine Lökosidin	23

2.6.1 TK-MRSA ve HK-MRSA Suşlarının Epidemiyolojisi	37
2.7 Moleküler Metotlar	42
2.7.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	43
2.7.2 “Pulsed Field Gel Electrophoresis” Yöntemi	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1 Hastalar ve <i>Staphylococcus aureus</i> izolatları	46
3.2 Kültür, Antibiyogram ve İdentifikasyon	46
3.2.1 Kullanılan Besiyerleri	47
3.2.2 Suşların İdentifikasyonu	48
3.2.3 Antibiyogram	49
3.2.3.1 Metisilin Direncinin Belirlenmesi	49
3.2.3.2 Disk Difüzyon Testi	49
3.3 <i>LukS/F-PV</i> ve <i>MecA</i> Gen Bölgelerinin Araştırılması	50
3.3.1 Suşların DNA Ekstraksiyonu	50
3.3.2 PCR ile Hedef Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	51
3.3.3 Hedef Gen Bölgelerinin Görüntülenmesi	53
3.4 <i>LukS/F-PV</i> Gen Bölgesi Pozitif Suşların Genotiplendirilmesi	57
3.4.1 PFGE Yönteminin Uygulanması	57
4. BULGULAR	66
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. ÖZET	90
8. ABSTRACT	93
9. KAYNAKLAR	95

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2. 1 <i>S. aureus</i> patogeneğinde rolü olan yüzey proteinleri	10
Tablo 2. 2 TK-MRSA ve HK-MRSA suşları arasındaki epidemiyolojik ve mikrobiyolojik özelliklerinin karşılaştırılması	41
Tablo 2. 3 TK-MRSA ayırımında CDC kriterleri	42
Tablo 3. 1 Oksasilin ve Sefoksitin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri	50
Tablo 3. 2 PVL varlığını belirlemek için kullanılan primer dizileri	51
Tablo 3. 3 2X Amplifikasyon tamponunun hazırlanması	51
Tablo 3. 4 PVL varlığını belirlemek için kullanılan PCR Amplifikasyon mastermiks protokolü	52
Tablo 3. 5 LukS/F-PV için Amplifikasyon Şartları	52
Tablo 3. 6 <i>MecA</i> varlığını belirlemek için kullanılan primer dizileri	53
Tablo 3. 7 <i>MecA</i> için Amplifikasyon programı	53
Tablo 4. 1 PVL pozitif bulunan toplum kökenli <i>S. aureus</i> suşlarının servis ve örnek tipine göre dağılımı	72
Tablo 4. 2 PVL pozitif bulunan hastane kökenli <i>S. aureus</i> suşlarının servis, örnek tipi ve etkene göre ayrıntılı dağılımı	73

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller Dizini

Şekil 2. 1	Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar.	8
Şekil 2. 2	PVL tarafından gerçekleştirilen hücre intoksikasyon mekanizması.	25
Şekil 2. 3	<i>LukF-PV</i> ve <i>lukS-PV</i> nin kristal yapıları	26
Şekil 2. 4	<i>LukS-PV</i> ve <i>lukF-PV</i> bölgelerinden oluşan <i>lukSF-PV</i> geninin yapısı	27
Şekil 2. 5	PVL'nin neden olduğu akut Akciğer hasarı	28
Şekil 2. 6	Lökosidal toksinlerin hücresel etkileri	30
Şekil 2. 7	PVL'nin doku nekrozuna ait örnek model	32
Şekil 2. 8	PVL pozitif ve PVL-negatif <i>S. aureus</i> suşları hasarlı insan solunum yolu dokusu ve insan solunum yolu epitel hücresi (HAEC) kültür in vivo ve in vitro testleri.	35
Şekil 2. 9	Toplum Kökenli ve Hastane Kökenli MRSA oluşumu	37
Şekil 2. 10	<i>S. aureus</i> suşlarının PVL gen bölgesini kazanmaları	39
Şekil 2. 11	PFGE sistem çeşitleri	45
Şekil 3. 1	Jel elektroforezde <i>lukS/F-PV</i> gen bölgesi sonuçlarının görünümü	56
Şekil 3. 2	Jel elektroforezde <i>mecA</i> gen bölgesi sonuçlarının görünümü.	57
Şekil 3. 3	PFGE sonrası DNA bant görüntüleri	64
Şekil 3. 4	Şematik olarak PFGE	65
Şekil 4. 1	Çalışmaya alınan Toplum Kökenli <i>S.aureus</i> suşlarının klinik örneklerle göre MRSA ve MSSA dağılımı	67
Şekil 4. 2	Çalışmaya alınan Hastane Kökenli <i>S.aureus</i> suşlarının klinik örneklerle göre MRSA ve MSSA dağılımı	68
Şekil 4. 3	Toplum Kökenli <i>S. aureus</i> suşlarının izole edildikleri servis ve polikliniklere dağılımı	69

Şekil 4. 4 Hastane Kökenli <i>S. aureus</i> suşlarının izole edildikleri kliniklere dağılımı	70
Şekil 4. 5 PVL gen bölgeleri pozitif ve negatif bulunan izolatlara ait PCR jel görüntüleri	71
Şekil 4. 6 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan <i>S. aureus</i> suşlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüleri	74
Şekil 4. 7 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan HK- <i>S. aureus</i> suşlarının PFGE dendogram görüntüleri	75
Şekil 4. 8 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan TK- <i>S. aureus</i> suşlarının PFGE dendogram görüntüleri	75

Resimler Dizini

Resim 3. 1 Yıkama sonrası agaroz kalıplar	60
Resim 3. 2 Kaset içine dökülen agaroz	62
Resim 3. 3 CHEF-DR II sistem (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium)	63

KISALTMALAR

MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PVL	: Panton-Valentine lükosidin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
TK- <i>S. aureus</i>	: Toplum kökenli <i>Staphylococcus aureus</i>
HK- <i>S. aureus</i>	: Hastane kökenli <i>Staphylococcus aureus</i>
Bax	: B-cell lymphoma-2 associated X protein
NAG	: N-asetil glukoz amin
NAM	: N-asetil müramik asit
CDC	: Center for Diseases Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
Hlg	: Gama hemolizin
CRF	: Coagulase-Reacting Factor
ORF	: Open Reading Frame
PBP	: Penisilin bağlayan protein
SCC<i>mec</i>	: Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
agr	: Accessory gene regulator
IVIg	: İntravenöz immunglobulin
MHA	: Müller Hinton agar
IgG	: Immunglobulin G
TSSI	: Toksik şok Sendromu Toksini

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam süresince benden ilgi, destek ve katkılarını esirgemeyen, tüm eğitimim boyunca yapıcı eleştiri ve önerilerinden çok faydalandığım, örnek özveri ve performanslarıyla yetişmemde büyük emeği geçen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU'na,

Çalışmamın moleküler kısmında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Barış OTLU'ya, çalışmalarım boyunca bana her zaman bilgi ve desteğiyle katkıda bulunan Doç. Dr Yusuf Yakupoğullarına, eğitimimde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı hocalarım; Prof. Dr. Selma AY'a, Doç. Dr. Çiğdem KUZUCU'ya ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. İ. Halil ÖZEROL'a sonsuz şükran duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman desteklerini esirgemeyen bütün asistan ve çalışma arkadaşlarıma,

Manevi desteğini esirgemeyen anneme, babama ve eşime teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Dr. Yücel DUMAN

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Neden oldukları mortalite, morbidite ve yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle, temel bir toplum sağlığı problemi oluşturan stafilokoklar arasında, içerdiği çeşitli virülans faktörleriyle en önemli patojen *Staphylococcus aureus*'tur. *S.aureus* özellikle cilt ve yumuşak doku olmak üzere (fronkül, selülit, impetigo gibi), derin doku enfeksiyonları (osteomyelit, septik artrit, endokardit, karaciğer, dalak absesi), pnömoni, bakteriyemi, endokardit, toksik şok sendromu gibi çeşitli enfeksiyonların önde gelen insan patojenidir. *S. aureus* tüm dünyada enfeksiyonlardan en sık izole edilen çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmalardandır (1–4).

S. aureus'a bağlı enfeksiyonların patogeneğinde, bakterinin yüzeyel komponentleri ve virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır. Virülans faktörleri arasında yer alan *Panton-Valentine lökosidin* (PVL) nötrofiller, monositler ve makrofajlarda por oluşumuna yol açarak, parçalanmalarına neden olmaktadır (2).

Toplum kökenli cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan önemli bir virülans faktörü olan PVL; ilk defa 1932 yılında Panton ve Valentine tarafından tarif edilen, lökositleri parçalayan, geniş doku nekrozuna ve ciddi enfeksiyona neden olabilen bir sitotoksindir (5). PVL taşıyan *S. aureus* suşları genellikle; nekrotizan piyojenik deri enfeksiyonları, sellülit, doku nekrozu, ayrıca; septik artrit, osteomyelit, pyomiyozit, sepsis, nekrotizan pnömoniye neden olabilmektedir (6–8).

Panton–Valentine l kosidin; *S.aureus*'un Gama-hemolizinleri ile birlikte bikomponent synergohymenotpropic toksinleri içinde bulunan spesifik ekzotoksinidir. Bunlardan biri F sınıfına (*LukF-PV*, *LukF-R*, *LukF-I*, *LukM*, *HlgB*), diğeri S sınıfına (*lukS-PV*, *lukS-R*, *lukS-I*, *HlgA*, *HlgC*) ait iki komponentten oluşur. İn vivo olarak bu l kosidal ürünlerin lokal ve jeneralize etkilerinin çok az bilinmesi nedeni ile, bu toksinlerin üretimi ve stafilokok enfeksiyonlarındaki patolojisi arasındaki ilişki ile çok az sayıda veri mevcuttur (2,3).

Panton–Valentine l kosidin sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte, hatta ölümlere neden olabilmektedir. Son iki dekatta tüm dünyada, bakteriyofaja bağlı PVL gen transferi ile PVL pozitif suşların klonal yayılımı önemli halk sağlığı problemlerine neden olmaktadır (7). Bu l kosidin, özellikle toplum kökenli *S.aureus* suşlarında sık görülmekle birlikte, yapılan alışmalar PVL pozitif suşların hastane ortamlarında da hızla yayılmaya başladığını göstermektedir (9). Hastanelerde yayılım gösteren mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle belirlenmesi; enfeksiyon seyrinin izlenmesi, uygulanan enfeksiyon kontrol önlemlerinin değerlendirilmesi, salgın sırasında izolatlar arasındaki klonal ilişkinin anlaşılması ve hakim klonların belirlenmesi açısından büyük yarar sağlamaktadır. Bu nedenle hastanemizde izole edilen *S.aureus* suşlarında PVL varlığı ve sıklığı araştırılarak, klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Tarihçe ve sınıflandırma

Stafilokoklar ilk kez 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Alexander Ogston ise 1881 yılında fare ve kobaylar için patojen olduğunu göstermiş, stafilokok adını ilk kez kullanmıştır. Rosenbach 1884'te iki farklı pigmente sahip stafilokok koloni tipi tanımlamış; *Staphylococcus aureus* (sarı) ve *Staphylococcus albus* (beyaz) olarak isimlendirmiştir. Doğada yaygın olarak bulunan stafilokok'lar; *Micrococcaceae* ailesi içinde yer alan 4 cins'ten (*Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*) biridir. Ancak ileri genetik çalışmalar (DNA-ribozomal RNA hibridizasyon, 16S rRNA sekans analizi) ve kemotaksonomik analizler (hücre duvar yapısı, hücresel yağ asitleri) sonrasında stafilokoklar; *Gamella*, *Macrococcus* ve *Salinicoccus* ile birlikte *Firmicutes* filum'un da aile V, genus 1'de (*Staphylococcaceae*) yer almıştır (10–14). Günümüzde, *Staphylococcus* cinsi 17'si insanlarda hastalık oluşturabilen ve klinik örneklerinden saptanmış toplam 35 türden oluşmaktadır (12,13,15). İnsanlarda hastalık etkeni olarak izole edilen stafilokoklar, Mikrobiyoloji laboratuvarlarında koagülaz enzim üretimlerine dayanılarak sınıflandırıldığında; yalnız *S. aureus* koagülaz pozitif olup; diğer stafilokok türleri ise koagülaz negatif stafilokoklar olarak değerlendirilmekte ve tanımlanmaktadır (12,13,15–17).

Stafilokoklar cilt, üst solunum yolları, gastrointestinal sistem ve vajinanın normal flora üyesidir. İnsan sağlığı açısından en önemli tür *Staphylococcus aureus*'tur. *S. aureus*, stafilokokal enterotoksin, toksik şok sendromu toksin-1, eksfoliyatif toksin ve *Panton-Valentine lökositidin* gibi klinik bulgulardan sorumlu bazı ekzoproteinler dahil 30'dan fazla farklı ekstrasellüler ürün salgılamaktadır. İnsanlarda kan, alt solunum yolu, deri ve yumuşak dokuyu içeren çeşitli bakteriyel enfeksiyonların önde gelen nedenidir (10,14,18).

Van de Velde 1894 yılında, *S. aureus* tarafından üretilen "*substans leukocide*" veya lökositidin olarak adlandırdığı, lökositlerin lizisine yol açan bir madde tespit etmiştir (19,20). 1932 yılında ise Panton ve Valentine farklı bir hemolitik lökotoksin keşfederek, bu lökositidin varlığı (PVL) ile özellikle bazı ölümcül olabilen enfeksiyonlar yanında karbonkül gibi ciddi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi göstermiştir (5,20). J. Wright ise 1936 yılında ilk kez "*Panton-Valentine lökositidin*" ismini kullanmıştır. 1957 yılında G.P. Gladstone ve W.E. van Heyningen PVL'nin granülositler ve makrofajlar üzerine selektif etkisini tanımlamışlardır. 1959 yılında ise A.M. Woodin PVL'yi saf olarak elde etmeyi başarmış, 'fast' F ve 'slow' S komponentlerini tarif etmiştir. 1972'de Kamio PVL geninin; phiPVL ve phiSLT ismini verdikleri iki bakteriofaj tarafından taşındığını göstermiş, S ve F komponentlerini oluşturan genleri tarif etmiştir. 1995 yılında ise Prevost ve arkadaşları PVL'yi sekanslayarak, katyon değişim kromatografisindeki ayrışma profillerine göre S (yavaş ayrışan-"slow eluted") ve F (hızlı ayrışan-"fast eluted") (*lukS-PV* ve *lukF-PV*) olarak adlandırılmışlardır (5,19,21-30).

Kraus ve Clairmont 1900 yılında alfa toksini, Glenny ve Stevens 1935'te beta toksinini, 1938'de Smith ve Price gama toksini, Williams ile Harper 1947'de delta toksini tanımlamışlardır. 1978 yılında ise Todd ve arkadaşları tarafından "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilin'i bulması ile stafilokoklara karşı 1940 yılında penisilin G tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, 1944 yılında penisilin'e dirençli, penisilini parçalayan enzim (penisilinaz) üreten suşlar Kirby tarafından tespit edilmiştir. 1950'li yıllarda penisilin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklere de direnç gelişimi gözlenmiştir (31). 1960'lı yıllarda penisilinaza dayanıklı metisilin, oksasilin, nafsilin

gibi yarı sentetik penisilinler kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 1961 yılında İngiltere’de ilk metisilin dirençli *S.aureus*’un (MRSA) gösterilmesi ile direnç gelişiminin önemi anlaşılmıştır. Metisilin direnç yayılımı 1970’li yıllarda sefalosporinlerin kullanımının artması ile hızlı bir ivme kazanmıştır. 1980’li yılların başlarından itibaren de MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. MRSA suşları tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir ve enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. İlk kez 1996 yılında Japonya’dan vankomisine orta duyarlı *S.aureus* bildirilmiş ve 2002 yılında ise A.B.D’de vankomisin dirençli *S.aureus* (VRSA) suşlarının saptanması, glikopeptidlere dirençli *S.aureus* suşlarını ortaya çıkarmıştır (32–34).

Her geçen gün hastane kökenli ve toplum kökenli *S. aureus* görülme sıklığı artmakta, salgıladığı enzim ve toksinler ve ayrıca çok kısa sürelerde antibiyotiklere direnç geliştirebilmesi nedeni ile tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır.

2.1.2 *Staphylococcus aureus*’un Genel özellikleri

Stafilokoklar hareketsiz, sporsuz, 0.5–1.5 µm çapında, mikroskopik görünümü üzüm salkımı şeklinde gruplar oluşturan, anaerop olan *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışında fakültatif anaerop Gram pozitif koklardır (12,13,35,36). *S. aureus*’un genomunda guanin-sitozin (G+C) oranı %32 dir. Yaklaşık 2400 baz çiftli gen taşıyan 2.8Mb’lık sirküler bir kromozom, genomun %84.5’ini oluşturan 2600 *Open Reading Frame (ORF)* bölgesi, profajlar, plazmidler ve transpozonlara sahiptir. Bakterinin virülans ve dirençten sorumlu genlerinin en sık aktarılma yolu transdüksiyondur (37,38).

Kanlı agar ve diğer adi besiyerlerinde aerop ve anaerop ortamda 37°C de kolayca üretilebilir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (%10 NaCl) ve 18–40°C de üreyebilme özelliklerine sahiptirler. Kanlı agarda 18–24 saatte kolonileri küçük, yuvarlak veya oval, düzgün kenarlı, mat, 1–4 mm çapında S koloniler yapar. Kanlı agarda *S. aureus* kökenlerin çoğunda beta hemoliz ve altın sarısı pigment görülür. Kolonilere altın sarısı rengini karotenoid pigmentleri vermektedir. Mikrokapsüle sahip suşlar mukoid koloni oluşturabilirler. Klinik materyalden stafilokokları izole

etmek için selektif besiyeri olarak mannitol tuzlu agar kullanılabilir. Bu agar %10 NaCl, mannitol ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısını içerir. Bu besiyerinde yüksek konsantrasyonda NaCl varlığında üreyebilen *S. aureus* mannitolu fermente ederek sarı hale ile çevrili koloniler oluşturur. %5 koyun kanlı agarda 24 saatte ürerken, mannitol ve NaCl agar ve diğer selektif besiyerlerinde üreme için en az 48–72 saat inkübasyon gerekli olabilmektedir (4,13,39).

Stafilokokların 200 µg/ml lizostafinle erimeleri, 0.04 U basitrasine dirençli, 100 µg furazolidona duyarlı, oksidaz negatif, anaerop ortamda glikozdan ve 0.4 µg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturmaları ile diğer Gram pozitif koklardan ayırt edilirler. Stafilokoklar kuru hava koşullarına, ısıya (50°C'ye 30 dakika) ve %10 sodyum klorüre dayanıklıdırlar. Fakat %3 Heksaklorofen gibi güçlü kimyasallar ile kolayca inaktive edilebilirler (13,39).

İnsanlar için major patojen olan *S. aureus* diğer stafilokoklardan farklı olarak koagülaz pozitifdir. Normal flora üyesi olan koagülaz negatif stafilokoklar ise nadiren enfeksiyonlara neden olabilir. Koagülaz negatif stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların yaklaşık %75'i *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *S. hominis* gibi suşlardan kaynaklanmaktadır. *S. saprophyticus* daha çok genç kadınlarda üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Diğer türler ise daha çok veterinerlikte önemlidir (12,13,39).

2.1.3 *Staphylococcus aureus*'un virulans faktörleri

2.1.3.1 Kapsüler Polisakkarit

Çoğu stafilokok, bir kaç polisakkarit içeren mikrokapsüller üretmektedir. Klinik izolatlarının %90'ından fazlasında polisakkarit kapsül üreten *S. aureus*'a ait farklı 11 kapsül serotipi bildirilmiştir. *S. aureus*'un kapsül tip 1 ve tip 2 izolatları fazla miktarlarda polisakkarit üretir ve kültür plaklarında mukoid görülür. Kapsül tip 5 ve 8 klinik enfeksiyonların %75'inden fazlasından sorumludur (4,12,40,41). Organizmanın polimorfonükleer lökosit (PMNL)'lerce sindirimini engelleyebilen bu ekzopolisakkarit, konak hücrelere ve protez cihazlara bağlanmada rol oynar.

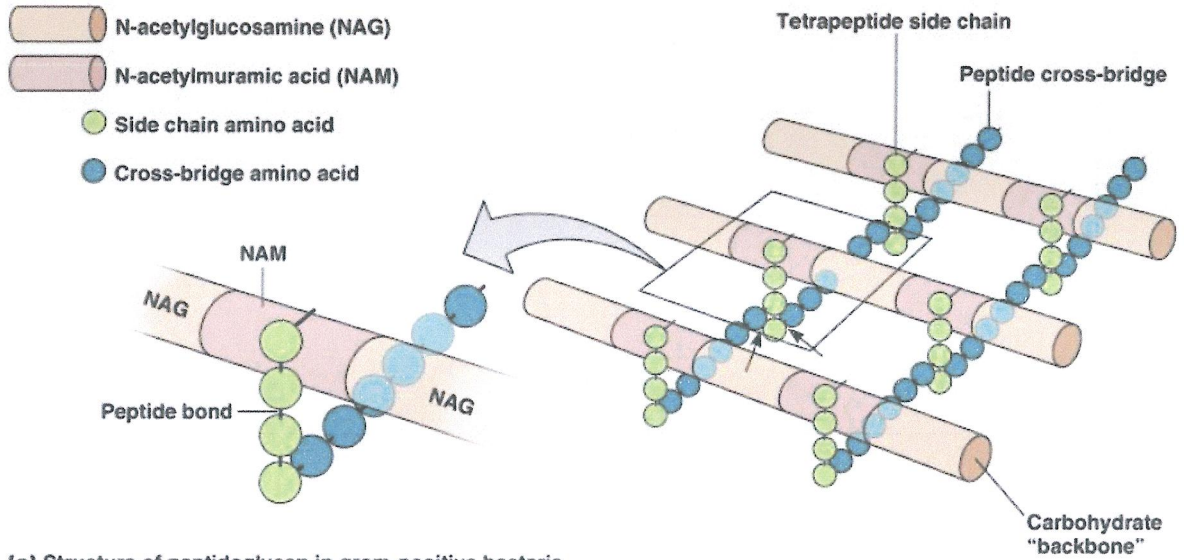
2.1.3.2 Hücre Duvarı Yapısı

Stafilokokların hücre duvarı; peptidoglikan, teikoik asit ve protein A olmak üzere üç ana komponentten oluşur. *S. aureus*'un hücre duvarının esas komponenti, hücre duvarının % 50'sini oluşturan peptidoglikan tabakadır (12,13,41).

2.1.3.2.1 Peptidoglikan tabaka

Peptidoglikan tabaka stafilokok hücre duvarının %50'sini oluşturur. Peptidoglikan tabakanın temel ögesi glikan zincirlerdir. Glikan zincir tabakalarından oluşan peptidoglikan iskelet N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin 10–12 değişken subunitinden meydana gelir. N-asetilmuramik asit subünitlerine bağlanan oligopeptit yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanırlar. Glikan zincir üzerinde, müramik asidin laktil grubuna bağlı tetrapeptid yapısı bulunmaktadır. Tetrapeptidin üçüncü pozisyonundaki diaminoasit ile diğer tetrapeptidin dördüncü pozisyonundaki D-Alanin arasında çapraz bağlar oluşur. Peptidoglikan tabakadaki çok sayıdaki çapraz bağ, bakterilerin hücre duvarlarının sağlam bir yapıya sahip olmasını sağlar. *S. aureus*' da çapraz bağ oranı yüksektir ve bu özellik bakterilerin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (41–43).

Peptidoglikan ayrıca kompleman aktivasyonu, endojen pirojenlerin salınımı, monositlerden interlökin–1 üretimini ve lökositlerin kemotaksisini stimüle eden endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir ve yaygın damar içi koagülasyona (DIC) yol açabilmektedir (12).



Şekil 2.1 Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar. NAG: Nasetilglikozamin, NAM: N-asetilmuramik asit (44)

2.1.3.2.2 Teikoik asit

Hücre duvarının diğer bir önemli komponenti, fosfodiester bağları ile bağlı ribitol fosfat polimerlerinden oluşan, hücre duvarının %30–50 sini oluşturan teikoik asittir. Teikoik asit yalnızca Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında peptidoglikana tutunmuş halde bulunur. Hücre yüzeyinde negatif yük oluşturarak çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda rol oynar, hücrenin bölünmesini sağlayan otolitik enzimlerin aktivitesini kontrol ederler. Ribitol teikoik asit *S. aureus* için özgüldür (12,13,42,45).

Teikoik asit mukozalarda bulunan özgül reseptörler (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek *S. aureus*'un konağa adherensini sağlar. İnflamatuvar hücrelerin kemotaksisini inhibe etme, antikor üretimini stimüle etme gibi virülans faktörü olarak ve hücre duvarlarının rijit ve çabuk yenilenebilir olmasında önemli rol oynar (13,42,45).

2.1.3.2.3 Protein-A

Hücre duvarının temel proteini olan ve yalnızca *S. aureus*'ta bulunan protein A; moleküler ağırlığı 42kDA olan tek polipeptid zincirinden oluşan bir virulans faktörüdür. *S. aureus* tarafından üretilen proteinin üçte birini, hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. Protein A'nın %90'ı hücre duvarında peptidoglikan tabakaya bağlı olarak bulunur (13,43,46).

S. aureus protein A aracılığıyla IgG3 hariç tüm insan IgG alt sınıflarının Fc bölgesine bağlanabilir. Protein A immünoglobulinlerin Fc bölgesine bağlanarak bakteriyi antikora bağlı fagositozdan korur. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak kompleman aktivasyonuna ve immunkompleks oluşumuna yol açar. İmmünoglobulinler ile nonspesifik olarak etkileşime girerek, antifagositik özellik gösterdiği için konakta aşırı duyarlılığa yol açabilir (13,43). Ayrıca kemotaktik ve mitojenik etkiler de gösterir. *S. aureus*'un koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile etkileşim gösterir. Protein-A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir identifikasyon testi olarak da kullanılabilir (9,12).

Protein A, *S. aureus*'a bağlı enfeksiyonların patogeneğinde önemli rolü yanı sıra, bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısında, in vitro olarak koagülünasyon testlerinde kullanılmaktadır. Protein A ile antikorun Fc kısmı birleştiğinde antikorun özgül bağlanma bölgesi olan Fab bölümü açıkta kalır. İncelenen materyalde aranan antijen varsa antijen-antikor kompleksi oluşmakta ve aglütinasyon gözle görülür hale gelmektedir (47).

Protein A, clumping faktör A ve B, kollajen bağlayıcı protein, fibronektin bağlayıcı protein A ve B, plazmin duyarlı protein, serin-aspartat tekrarlayıcı protein, *S. aureus* yüzey protein A-K, fibrinojen, elastin, kollajen gibi yüzey proteinleri konak matriks proteinlerine tutunmada önemlidir (13). (Tablo 2. 1)

Tablo 2.1 *S. aureus* patogenezinde rolü olan yüzey proteinleri (48)

Proteinler	Patogenezdaki Rolü
Fibronektin- bağlanma proteini (FnbpA ve FnbpB)	Epitel ve endotel hücrelerine bağlanma
Fibrinojen- bağlanma proteini (ClfA ve ClfB)	Fibrinojen içeren maddeler adherans
Kollagen- bağlanma proteini (Cna)	Kollajenöz doku ve yüzeylere adherans.
Elastin- bağlanma proteini (Ebbs)	Bakteri kolonizasyon için elastinin N-terminal ucuna bağlanma
Ekstrasellüler matris bağlanma proteini (Ebh)	Endotelial hücrelere adherans
Protein A (Spa)	İmmüno globulin G'ye (IgG) bağlanma
Kapsüler polisakkarid (CP)	Opsonofagositozdan korunma
Serin-aspartat tekrar proteini	Muhtemelen fibrinojene bağlanır
Plazmin duyarlı protein	Nazal mukoza hücrelerine bağlanma
Protein A-K yüzey proteini	Bilinmiyor

2.1.3.3 *S.aureus*'un enzimleri

2.1.3.3.1 Katalaz

Stafilokoklar; streptokoklar, enterekoklar ve streptokok benzeri bakterilerden katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler. Hemoprotein yapısındadır. Katalaz enzimi fagositik hücrelerce salgılanan hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalar (4,12,13,29,31,41,49).

2.1.3.3.2 Koagülaz

S. aureus suşları ekstrasellüler olarak salınan ve hücre duvarında bulunan; serbest ve bağlı olmak üzere 2 çeşit koagülaz enzimine sahiptir. Serbest koagülaz, plazma globulini olan Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombini oluşturan bir proteindir. Stafilotrombin ise fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar. Bağlı koagülaz (clumping faktör), salınmayan hücre duvarındaki yüzey proteindir. Bu faktör direkt olarak plazmadaki fibrinojen ile tepkimeye girer.

Bakteri koagülaz enzimi ile etrafında bir fibrin ağı oluşturup, fagositozdan korunmayı sağlar (4,12,13,41,50).

2.1.3.3.3 Stafilokinaz (Fibrinolizin)

Fibrin pıhtısını parçalayarak enfeksiyonun diğer dokulara yayılımını sağlar. Plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki plazmin aracılığıyla oluşur (12,13).

2.1.3.3.4 Hiyalüronidaz

S.aureus suşlarının %90'ı hiyaluronidaz salgılar. Hiyaluronidaz antijenik özelliğe sahip, bağ dokusunun aselüler matriksinde bulunan hiyalüronik asidi hidrolize ederek *S. aureus*'un dokulara yayılımını sağlayan enzimdir (4,12,50).

2.1.3.3.5 Lipaz

Lipitleri hidrolize eden bu enzim *S. aureus*'un tüm suşları tarafından salgılanır. *S. aureus* suşlarının kutanöz ve subkutanöz dokularda yayılımını sağlayarak kronik fronküle neden olur (12,13).

2.1.3.3.6 Deoksiribonükleaz

Deoksiribonükleaz (DNaz) enzimi; nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan, ekzo ve endonükleaz aktivitesi gösteren bir fosfodiesterazlardır. Diğer bazı türler de bu enzimi üretiliyor olmasına rağmen, *S. aureus* için önemli bir göstergedir (12,13,50).

2.1.3.3.7 Beta laktamaz

Penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak stafilokoklarda penisilin direncine neden olur. İmmünolojik çalışmalar *S. aureus*'un en az üç farklı tip beta laktamaz salgıladığını göstermiştir. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır (12,13,42).

2.1.4 *S. aureus*'un Toksin ve Hemolizinleri

S. aureus; eksfoliyatif toksin (A ve B), enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I), toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) ve sitolitik veya membran hasarına yol açan hemolizinleri içeren (alfa, beta, delta, gama ve *Panton-Valentine* lökosidin) çok sayıda virülans faktörü üretir. Eksfoliyatif toksin A, TSST-1 ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptitler sınıfına aittir (12,13,39,50).

2.1.4.1 Eksfoliyatif toksinler (Epidermolitik toksin)

Serin proteazı olan eksfoliyatif toksinin antijenik ve biyokimyasal olarak iki farklı moleküler şekli (ETA ve ETB) tanımlanmıştır. Her iki molekül benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. ETA ısıya dirençli ve kromozomal, ETB ise ısıya duyarlı ve plazmid aracılıdır. Bu toksin epiderminin stratum granulosum tabakasındaki intrasellüler köprülerin (desmozomlar) ayrılmasını sağlayarak haşlanmış deri sendromuna neden olur (12,13,50,51). Haşlanmış deri sendromu genellikle yeni doğanlarda ve çocuklarda görülmektedir (39). Epiderminin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişmektedir (12,13,50,51).

2.1.4.2 Enterotoksinler

S. aureus suşlarının yaklaşık %30-50'si tarafından üretilen, serolojik olarak 8 farklı enterotoksin, (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin 3 alt tipi tanımlanmıştır. Enterotoksinler termo-stabil olup, barsak enzimlerine dirençlidir. Enterotoksin A en sık besin zehirlenmesine sebep olan tiptir. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunur. Enterotoksin B ise stafilokokal pseudomembranöz enterokolit tablosuna neden olur. Enterotoksinler süperantijen özelliği göstererek, sitokin salınımı ve T hücrelerinin nonspesifik aktivasyonunu sağlayabilmektedirler (12,13,50,51).

2.1.4.3 Toksik şok sendrom toksini (TSST)

TSST- 1 en sık TŞS yol açan ısı ve proteolize dirençli, potent bir süper antijendir. Toksinin potansi T-hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu uyarabilmesine bağlıdır (diğer antijenlerden 10.000 kat daha fazla). TSST-1 MHC sınıf II moleküllerine bağlanarak; T hücrelerinde stimülasyonunu, monositlerden IL-1 salınımını uyararak, toksik şok sendromu bulguları ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Toksik sok sendromu; ateş, kusma, diyare, böbrek yetmezliği gibi klinik belirtiler gösterip; ölüm hipovolemik şok'a bağlı multiorgan yetmezliği nedeniyle gelişmektedir (4,39,52).

2.1.4.4 Alfa hemolizin

S. aureus suşlarının çoğu tarafından üretilen, kromozomal ve plazmid tarafından kodlanabilen 33 kD moleküler ağırlığında bir polipeptittir. İlk kez 1900'de Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır. *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Bu hemolizin damar düz kas hücreleri, hepatosit, eritrosit, lökosit ve trombosit gibi birçok hücrede hasara neden olur. Hücre membranında por oluşumuna yol açarak; K^+ un hücre dışına atılımı, Na^+ , Ca^{+} un hücre içine alımı ile hücre parçalanmasına neden olabilmektedir (9,12,13,53).

2.1.4.5 Beta hemolizin

İlk kez 1935'te Glenny ve Stevens tarafından tanımlanan beta hemolizin; Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan 35 kD'lik ısıya duyarlı bir proteindir. Beta hemolizin sfingomiyelin ve lizofosfotidilkolin için spesifiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Alfa hemolizinle birlikte stafilokokal hastalıkların karakteristik özelliği olan abse formasyonu oluşumundan ve doku yıkımından sorumludur (9,12,13).

2.1.4.6 Delta hemolizin

1947'de Williams ve Harper tanımlamış, *S. aureus* tarafından üretilen 3 kD'lik bir polipeptittir. Nispeten ısıya dayanıklıdır. Bu hemolizin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerine etkilidir. Delta hemolizin kısmi

nonspesifik membran toksisitesi ile deterjan benzeri etki göstererek, hücre membranında porlar oluşturur. Ayrıca adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Antijenik özelliği yoktur (12,13,54).

2.1.4.7 Bikomponent hemolizinler

Bir grup *S. aureus* hemolizini sinergohimenotropik toksinler olarak adlandırılan, S (yavaş) ve F (hızlı) komponenti olan iki sinerjik protein içerir. Bu grup; PVL, gama hemolizin ve LukE-LukD gibi diğer lökositinleri içermektedir (8).

2.1.4.7.1 Gama hemolizin

1938'de Smith ve Price tarafından tanımlanmış ve 3 kDa ağırlığındadır. Gama hemolizini kodlayan genler *S. aureus* klinik izolatların da %99 oranında rastlanmaktadır (55). PVL ile birlikte iki polipeptit zincirinden oluşan, bikomponent sitotoksinler içerisinde yer almaktadır. Gama hemolizin insanlarda ve hayvanlarda eritrositleri lizise uğratar. Bikomponent toksinlerin sitolitik etkisi hücre membranında por oluşumuna bağlıdır (56).

2.1.4.7.2 Lökotoksin LukE/LukD

Bu toksin; *LukE* S protein sınıfı, *LukD* F sınıfı protein özelliği olan stafilokokal bikomponent lökotoksin ailesinin bir üyesidir. LukE/LukD, tavşan derisi enjekte edildiğinde PVL kadar etkili cilt nekrozunu uyarır, ancak hemolitik değildir ve *S. aureus* tarafından eksprese edilen diğer lökotoksinlere göre zayıf lökotoksik etki gösterir (2,56,57).

2.1.4.7.3 Panton Valentine Lökositin (PVL)

Panton-Valentine lökositin; insan polimorfonükleer nötrofiller, monositler ve makrofajlarda litik aktivitesiyle porlar oluşturarak yıkıma yol açan bir lökotoksindir. Tez konumuz olan PVL bölüm 2. 6'da kapsamlı olarak ele alınmıştır.

2.2. *S. aureus*'un identifikasyonu

2.2.1. Koloni Tiplendirme

S. aureus, 35°C'de 18–24 saat, etüvde inkübasyon sonrası; kanlı agarda genelde düzgün kenarlı, yuvarlak, sarı-turuncu koloniler oluşturur. Bazı *S. aureus* suşlar kanlı agarda beta-hemoliz zonu oluşturmaktadır (12,13,41,58).

2.2.2. Gram Boyama

Öze yardımıyla alınan stafilokok kolonisi temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik ile süspanse edilir. Lam üzerine tespit işlemi sonrasında, kristal viyole (1 dakika), lügol eriyiği (1 dakika)'nde bekletilir, %96'luk etil alkol ile yıkanır, son olarak bazik fuksin'de 30 saniye bekletilerek Gram boyama gerçekleştirilir. Preparat ışık mikroskobunun x100'lük objektifinde incelenerek, Gram pozitif üzüm salkımına benzer görüntüde kümelenmiş koklar stafilokok olarak tanımlanır (13,41,58).

2.2.3. Katalaz Testi

Bu test ile katalaz enzimlerinin varlığı tespit edilir. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayrıştırır. Bir lama öze yardımıyla alınan koloniler üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatılır. Kabarcık oluşması pozitif sonuç olarak kabul edilir (4,9,12,13,49,58).

2.2.4. Koagülaz Testi

S. aureus suşlarını diğer stafilokoklardan ayırmada kullanılan temel testtir. İki farklı şekilde yapılmaktadır.

2.2.4.1. Bağlı Koagülaz Testi (Lam Deneyi)

S.aureus suşlarının çoğu hücre duvarında bağlı koagülaza veya 'clumping faktör'e sahiptir. Lam üzerine bir damla serum fizyolojik içine *S. aureus* kolonisi süspanse edilerek homojen bir süspanسیون oluşturulur. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen

kolonilerden yapılabilir. Yüksek tuz konsantrasyonu bazı *S. aureus* suşlarında oto aglütinasyona neden olduğundan, yüksek tuz konsantrasyonu içeren besiyerinden alınan koloniler kullanılmamalıdır. Hazırlanan süspansiyon üzerine sulandırılmış plazma damlatılır. 5–10 saniye içinde aglütinasyonun oluşması bu testin pozitif olduğunu gösterir. Lam koagülaz testi ile *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi bazı koagülaz negatif suşlar clumping faktör üretip pozitif sonuç verebilmektedir (12,13,58).

2.2.4.2. Serbest Koagülaz Testi (Tüp Deneyi)

Tüp koagülaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testtir. Ekstraselüler olarak salınan serbest koagülaz, plazmada Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin, fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler.

Bir tüp içerisine sulandırılmış 1ml EDTA'lı tavşan plazmasına, taze buyyon kültüründe üretilmiş stafilokoklardan 1ml ilave edilir. 35°C'de inkübasyona bırakılır. Bazı suşlar uzayan inkübasyon periyodunda fibrinolizin üreteceği için 4 saat sonra pıhtılaşma gözlenmez ise tüp oda ısısına bırakılarak 18–24 saat sonra tekrar değerlendirilir. Pıhtılaşma olması sonucun pozitif olduğunu gösterir. Lam ve tüp koagülaz testi için önerilen; EDTA'lı tavşan plazması kullanılmasıdır. Tüp deneyi *S. aureus*'un belirlenmesi için en güvenli testtir (12,13,41,58).

2.2.5. Deoksiribonükleaz (DNase) Testi

S. aureus suşları endo ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip DNase ve termostabil nükleaz enzimini üretir. Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asitleri hidrolize ederek oligonükleotidler oluştururlar. DNase enziminin tespiti *S. aureus* suşlarının ayrımında önemlidir. Bu test, içerisinde DNA olan ticari besiyerleri kullanılarak yapılır. Bu özel besiyerlerine ekilen *S. aureus* suşları, ürettikleri DNase enzimi ile ortamdaki DNA'yı hidrolize ederek, kolonilerin etrafında şeffaf bölgeler meydana getirir. Besiyerine indikatör olarak toluidin mavisi konulmuş ise parlak pembe, Methyl green konmuş besiyerinde ise yeşil bir zon oluşur (9,12,13,41,58).

2.2.6. Thermostable endonükleaz testi

Bu testte DNase besiyerine 3 mm çapında çukur açılır, sıcak su banyosunda 15 dakika kaynamış sıvı bakteri kültürü kuyucuklara eklenir. Plaklar 1 gece 35°C'de inkübe edilerek çukurların çevresinde pembe bir hale oluşup oluşmadığı izlenir. Bazı koagülaz negatif stafilokoklar (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus*) ve bazı hayvan izolatları (*S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus*) zayıf pozitif sonuç verebilirler. *S. aureus* endonükleaz testinin özgüllüğü, *S. aureus* enzimlerine karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikorlarla sero-inhibisyon reaksiyonu veya *S. aureus* ısı stabil endonükleazını kodlayan *nuc* geni PZR ile gösterilerek doğrulanabilir (9,12,13,41,58).

2.2.7. Mannitol Fermantasyonu

S. aureus suşları mannitolü fermente edebilir. İdentifikasyonda %1 mannitol, %7,5 NaCl, fenol kırmızısı ve peptonlar içeren mannitol-salt agar seçici besiyeri olarak kullanılmaktadır. Besiyerinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonu diğer bakterilerin üremesini engeller. *S. aureus* kolonilerinin etrafı, mannitolün fermentasyonu sonucu, asit oluşumuna bağlı olarak sarıya dönmesi ile ayırt edilir. (9,12,13,41,58).

2.2.8. Basitrasine duyarlılık testi

Stafilokokları mikrokoklardan ayrımında kullanılır. Stafilokoklar basitrasine dirençli iken, mikrokoklar çapı 10 mm ve üzerinde zon açarlar (12,13).

2.3. *S. aureus*'un Klinik Enfeksiyonları

S.aureus'un temel özelliği, sağlıklı bireylerde asemptomatik olarak kolonize olma yeteneğidir. Taşıyıcıların bireyler arasında bakterinin yayılımında önemli bir kaynak olduğu tahmin edilmektedir. *S. aureus*, geniş bir yelpazede yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan çok yönlü bir patojendir (12,13,59). *S.aureus*'un enfeksiyon yapabilmesi, mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sistemi arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Konak savunma sistemine ait faktörlerin başında fagositer sisteme ait yetersizlikler gelmektedir. Yoğun bakım ve cerrahi hastaları,

nötropenik hastalar, malnütrüsyonlular, hemodiyaliz hastaları, immün yetmezliği olanlar, steroid kullananlar, yeni doğanlar, diyabet hastaları *S. aureus* enfeksiyonu yönünden yüksek risk gruplarıdır. Başta influenza enfeksiyonu olmak üzere viral enfeksiyonlar *S. aureus* enfeksiyon sıklığını artırır (50). *S. aureus* en sık toplum ve hastane kaynaklı; sepsis, alt solunum yolu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmektedir (12,13,60).

S. aureus enfeksiyonları üç tipe ayrılmaktadır;

- Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları,
- Gıda zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu ve toksik şok sendromu gibi toksine bağlı enfeksiyonlar,
- Endokardit, osteomyelit, pnömoni, beyin apsesi, menenjit ve bakteriyemi gibi sistemik ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar (61).

2.3.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

İnsanlarda *S. aureus* 'un neden olduğu enfeksiyonların başında gelmektedir. *S. aureus* temel olarak apse veya piyojenik eksuda oluşumuna neden olup klinik formları tutulan anatomik yapıya ve bölgeye göre değişir. Kıl folikülünün enfeksiyonu folikülit, dermisin derin katlarına yayılımı fronkül, karbonkül ve hidradenitis süpürativa, subkutan dokulara yayılımı erizipel; sellülit, fasiit diye adlandırılmaktadır. Yeni doğanlarda ve çocuklarda çok bulaşıcı olan impetigo sık görülüp ve epidemiler meydana getirebilmektedir. Emziren kadınların da %1-3'ünde *S. aureus* ile ilişkili mastit geliştiği gözlenmiştir (4,12,13,41,54,62,63).

2.3.2. Sistemik Enfeksiyonlar

2.3.2.1. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları

Travma veya penetran yaralanmalar sonrasında *S. aureus* kemik ve eklem dokusuna direkt inokulasyonla enfeksiyona neden olmakta, lokalize başlayan enfeksiyonun hematogen yayılımı sonucu osteomyelit veya septik artrit görülebilmektedir. Osteomyelit vakalarının %50-70 kadarından *S. aureus*

sorumludur. Çocuk ve erişkin nongonokokal septik artritlerde en sık sorumlu etken *S. aureus* olup, erişkinlerde genelde romatoid artrite sekonder olarak gelişmektedir (4,41,62–65).

2.3.2.2. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

İlk olarak influenza'nın bir komplikasyonu olarak tanımlanan *S. aureus* pnömonisi, 1918 influenza pandemisi kayıtlarında genç bireylerdeki ölümlerin çoğu *S. aureus*'un neden olduğu süper enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir. *S. aureus* toplumdan kazanılmış pnömonilerin %10'undan, hastanede kazanılmış pnömonilerin ise %20–30'undan sorumludur (66,67). Toplum kökenli *S. aureus* pnömonisi daha çok viral alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra, immünsuprese, diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda görülmüştür. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonisi ise aspirasyon veya entübasyon ile ilişkili olarak meydana gelmekte ve pulmoner enfeksiyon, abse oluşumu ve plevral empiyem gibi lokal komplikasyonlara yol açabilmektedir (4,54,62,66).

2.3.2.3. Endokardit

S. aureus bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biri infektif endokardittir. Akut bakteriyel endokarditin en sık nedeni *S. aureus*'dur. Bakteriyel endokardit olgularının %20-30'unda etken Stafilokoklar, bunların da %80-90'ında etken *S. aureus*'dur. Romatizmal kalp hastalığı, intravenöz ilaç kullanımı, diyaliz, intravasküler protez, yaşlı hastalarda kapak sklerozu *S. aureus* endokarditi için predispozan faktörlerdir. Mitral veya aort kapak tutulumlarında mortalite %40'lara kadar varmaktadır (68–70).

2.3.2.4 Bakteriyemi

S. aureus bakteriyemisi genelde abse, yanık, pnömoni gibi lokalize enfeksiyonlara ikincil veya direkt olarak kateter, diğer cerrahi girişimler veya iv ilaç bağımlılarında şırınga kullanımına bağlı olarak gelişebilir. *S. aureus* bakteriyemisi; hastaneye yatıştan iki günden sonra kazanılan hastane kaynaklı bakteriyemi, hastaneye başvuru esnasında veya yatışın ilk iki gününde saptanan toplumdan

kazanılmış bakteriyemi şeklinde iki grupta ele alınabilir. Hem toplum hem de hastane kökenli bakteriyemiler, uygun antibiyotik tedavisine rağmen yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (4,13,50,63,71).

2.3.2.5 Menenjit

S. aureus'a bağlı menenjit olguları genellikle bakteriyemilerin komplikasyonu, lokal kafa travmaları veya girişimleri ya da intratekal şantlara bağlı olarak gelişmektedir (12,13).

2.3.3 Toksinlere Bağlı Olarak Gelişen Enfeksiyonlar

2.3.3.1 Stafilokokal Besin Zehirlenmesi

Isıya dirençli, kaynatma veya pişirme ile inaktive olmayan enterotoksin B ve diğer enterotoksinlerle kontamine gıdaların yenilmesi sonucu ortaya çıkar. Uygun olmayan koşullarda saklanmış sütü tatlılar, dondurma, konserve, etli gıdalar, patates salatası en sık rastlanan sorumlu besinlerdir. Hastalık bulantı, kusma, abdominal kramplar ve ishal bulguları ile 2–6 saatlik inkubasyondan sonra başlar. Karakteristik olarak ateş ve nörolojik bulgusu yoktur. Semptomlar genellikle 8–10 saatte kendiliğinden düzelir ve prognozu iyidir (9,12,13,63).

2.3.3.2 Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

1878 yılında İlk kez Alman Doktor Baron Gotfried Ritter von Rittershain tarafından tanımlanmıştır. “Ritter’in hastalığı” olarak anılmaktadır. Ciltte geniş büllöz formasyon ve süperfisiyal deri katmanının soyulması ile karakterize klinik tablodur. Genelde neonatal ve infantlarda görülür. Ciddi sıvı elektrolit kaybı sonucunda hipovolemi ve %1–10 oranında ölüm görülür. Lezyondan *S. aureus* gösterilemez. Toksin antijenik olduğundan oluşan antikorlar koruyucudur (4,12,13,50,54,72,73).

2.3.3.3 Toksik Şok Sendromu (TSS)

Toksik şok sendromu, ilk kez 1978'de Todd tarafından tarif edilen, ateş, titreme, baş dönmesi, baş ağrısı, kusma, hipotansiyon, diyare, eritroderma ve konjonktivit gibi multisistem bulguları olan klinik tablodur. Bu multisistem hastalığı kadınlarda menstruasyon sırasında tampon kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Bazı vakalarda menstruasyonla ilişkisi olmayan toksik şok sendromu gözlenmiştir. Menstruasyonla ilişkisi olmayan toksik şok sendromu *S. aureus* enfeksiyonu sonucu oluşan sellülit, abse, lenfadenit, sinüzit, trakeit, pnömoni, ampiyem, artrit ve osteomyelit gibi klinik tablolar ile görülebileceği de bildirilmiştir (4,50,52,64,74,75).

2.4 *S. aureus*'larda Metisilin Direnci

S. aureus'da metisilin direnci DNA segmentinde lokalize 2kb'lık "*mec A*" geni tarafından kodlanan penisilin bağlayan protein-2a (PBP-2a) yapımına bağlıdır (76–79). *Mec A*; *S. aureus* kromozomu içine entegre genetik eleman stafilokok kromozomal kaset *mec* (SCC*mec*) içinde bulunmaktadır. PBP'ler bakteri hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglikan ağın birleşmesinde, terminal çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen, membrana bağlı, yapısal olarak beta-laktamazlara çok benzeyen, D,D-transpeptidaz ve D,D-karboksiptidaz enzimleridir. Görevleri bakteri için yaşamsaldır. PBP'ler moleküler ağırlıklarına göre 1–4 arası sayılar ile adlandırılırlar. Aynı molekül ağırlığında birden fazla PBP varsa o zaman sayıların yanına harfler eklenir (PBP 1a gibi). Beta-laktam ajanlar PBP'lerin substrat analoglarıdır. N-asetil muramik asit-pentapeptid ünitesinin son kısmında yer alan D alanil-D alanin dipeptidin'e benzerler. Bu nedenle, PBP'ler aynen beta-laktamazlar gibi beta-laktam ajanlara bağlanır ve hidrolize ederler. Ancak hidroliz hızları o denli yavaştır ki, olay geri dönüşmez bir açıl-enzim kompleksi oluşması, ilacın açıl türevinden ayrılamayan enzimin duvar sentezindeki görevini yapamaması, hücre duvar sentezinin durması ve yapım-yıkım dengesinin yıkım yönünde bozulması ile sonuçlanır (77–83).

PBP-2a proteinini üreten *S. aureus* suşları beta-laktam antibiyotik varlığında da peptidoglikan sentezini sürdürürler. Metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için *mec A* geninin eksprese olması gerekir. Ancak her suşta aynı şekilde ekspresyon

olmamaktadır. Bu nedenle *mec A* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli ve hatta duyarlı stafilokoklar olabilmektedir (76,84,85).

Mec A transpozon kökenlidir ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. Sıklıkla diğer direnç genleri ile birlikte bulunduğundan, MRSA suşları genellikle makrolidler ve kinolonlar gibi diğer antibiyotik gruplarına da dirençlidirler. Nadiren *mec A* negatif olmasına rağmen oksasiline MİK değerleri 8–16 mg/L civarında olan dirençli suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın aşırı üretiminden, bir kısmı da var olan PBP'lerdeki nokta mutasyonlarından veya PBP 4 (düşük molekül ağırlıklı PBP)'ün aşırı yapımından kaynaklanabilmektedir (86–88).

2.5 Epidemiyoloji ve korunma

S. aureus pek çok yeni doğan, çocuk ve yetişkinin özellikle nazofarenkslerinde, bazen cilt ve giysilerinde, daha nadiren vajinalarında ya da istisnai olarak rektum veya perineal bölgelerinde kolonize olmaktadır. Buradan bakteri, direkt olarak ellerle temasla, indirekt olarak aerosol yolla kişiden kişiye bulaşabilir. Mevsimsel ve bölgesel epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak, yetişkinlerdeki nazal taşıyıcılık oranı %20 ile %40 arasında değişmektedir. Nüfusun yaklaşık %20'si kronik, %60'ı geçici olarak *S. aureus* ile kolonize olur, %20'si ise hiç kolonize olmaz. Sağlık çalışanları *S. aureus* ile normal popülasyona oranla çok daha yüksek oranda kolonize olmaya eğilimlidir (39,62,64).

S. aureus invazyonuna karşı, mukoz membranlar ve cilt mekanik bariyer oluştururlar. Bu bariyer cerrahi girişim ya da travma ile bozulursa, *S. aureus* invaze olarak, lokal abse formasyonuna yol açabilir. Bakteri lokal fagositik mekanizmaları aşarak, lenfatik sisteme ve kan dolaşımına geçebilir.

Hastane ortamında yüksek oranda taşıyıcılığa rastlanmaktadır. Buna bağlı olarak *S. aureus*'un çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirme yeteneği ve dış etkenlere dirençli olması; hastane enfeksiyonlarında sık rastlanmasına neden olur (39,62,64).

Dikkat edilmesi gereken temel koruyucu anlayış ellerin yıkanmasıdır. Özellikle hastane personelinde etkenin yayılımının önlenmesi için el yıkama alışkanlığının kazandırılması gerekmektedir.

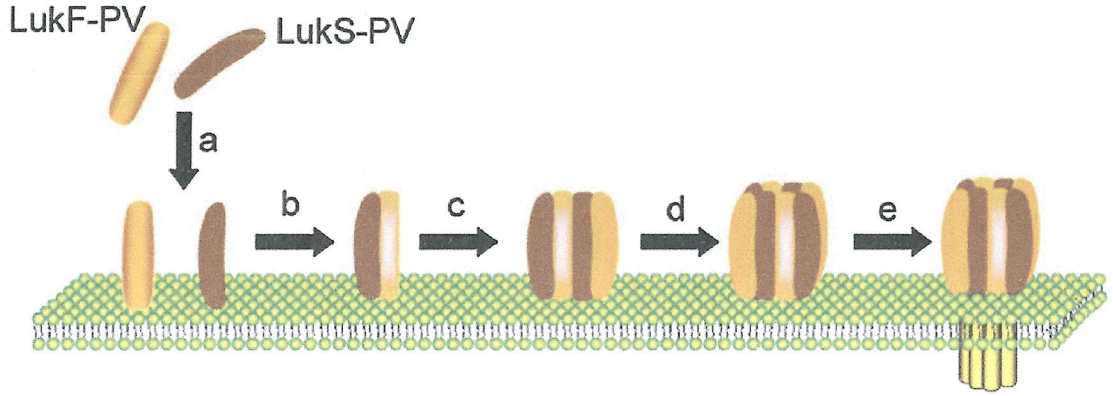
2.6 PANTON VALENTİNE LÖKOSİDİN (PVL)

S. aureus hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonların, ayrıca hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biridir. *S. aureus*'un salgıladığı, konak savunmasında önemli olan polimorfonükleer (PMNL), bazofil lökosit ve makrofajlar üzerine sitolitik etkisi olan ekzotoksinler; *S. aureus*'un virülansında önemli rol oynarlar (89). *S. aureus*, *Panton-Valentine lökositidin* (lukS-PV + LukF-PV), gama hemolizin (HlgA + HlgB ve HlgC + HlgB), LukM (LukM-PV+LukF'-PV) ve Luke/D (LukE+LukD) isimli bikomponent por oluşturan sinergohimenotropik toksinler eksprese etmektedir (2,56,90,91). Por oluşturan *S.aureus* toksinleri immün sistemden kaçış için kritik role sahiptir. Enfeksiyonun ilk aşamasında, hedef hücre membranında, por oluşturuvcu toksinler hücre ölümünü uyararak bakteriye avantaj sağlayabilmektedirler (20,91–95).

Woodin tarafından saflaştırılan *Panton-Valentine lökositidin*; insan ve tavşan polimorfonükleer nötrofil, monosit ve makrofajlarını hedef alan özgül litik aktivitesi ile porlar oluşturarak; lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna yol açan bir sitotoksindir (20,92–94). Aktivitesini birbiri ile ilişkili olmayan iki sekreteruar proteinin (*lukS-PV* ve *LukF-PV*) sinerjik etkisi ile gösteren sinergohimenotropik, bikomponent por oluşturan ekzotoksindir. *Panton-Valentine lökositidin* hem MRSA hem de MSSA suşlarında bulunabilir (96). *S. aureus*'un eksprese ettiği F sınıfı proteinler; *LukF-PV*, *LukF-R*, *LukF-I*, *LukM*, *HlgB*, S sınıfı proteinler ise *LukS-PV*, *lukS-R*, *lukS-I*, *HlgA*, *HlgC* dir. PVL'nin insan polimorfonükleer lökositleri ve makrofajlarına karşı yüksek sitolitik özgülük göstermesi, fronkül, apse, nekrotik cilt enfeksiyonları gibi birçok kutanöz nekrotik lezyonlar ve ciddi nekrotik hemorajik pnömoni ile yakından ilişkili olması nedeni ile *S. aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörü olduğuna inanılmaktadır (8,30,89,97–99).

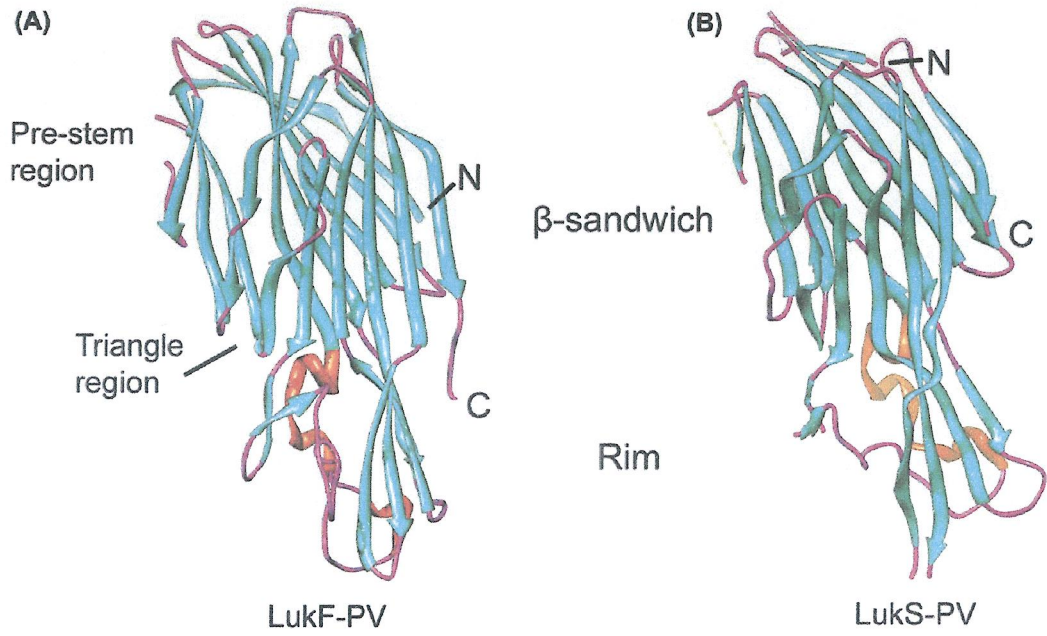
Panton-Valentine l kosidin gen ürünleri birlikte kodlanan ve aktarılan (*lukS-PV* ve *lukF-PV*) spesifik ılımlı bakteriyofaj tarafından taşınan iki yapılı (bikomponent sinergohimenotropik toksin) heterooligomerlerdir. Duyarlı konak hücrelerinde plazma membranındaki, bağlanma bölgeleri veya reseptör aracılığı ile sitolitik por oluşturma aktivitelerini, bu iki proteinin sinerjik etkisi ile göstermektedirler (20,26,55,93,100). PVL'yi kodlayan genler, Prevost ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada klonlanıp, sekanslanarak katyon değişim kromatografisindeki ayrılma profillerine göre S (yavaş ayrılşan-“slow eluted”) ve F (hızlı ayrılşan-“fast eluted”) (*lukS-PV* ve *lukF-PV*) olarak adlandırılmıştır. *LukS-PV* geni 28 aminoasitlik bir sinyal dizisi içeren 312 aminoasitten oluşan bir polipeptid, *lukF-PV* geni ise 24 aminoasitlik bir sinyal dizisi içeren 325 aminoasitten oluşan bir polipeptid kodlamaktadır (20,55,101,102).

İki sinerjik PVL komponenti olan *lukS-PV* ve *lukF-PV*'nin etkisini gösterebilmesi için hücre membranında bir dizi etkinlik gerekir. İlk olarak suda  z nebilir *LukF-PV* ve *lukS-PV* monomerleri membran yüzeyini agrege ederek heterodimerler oluşturur. Daha sonra bu heterodimerler, *LukF-PV* ve *lukS-PV* sub- nitleri için karakterize heterotetramerlere oligomerize olurlar. Bu heterotetramerler, *lukS-PV* ve *LukF-PV* sub nitlerinin 1:1 stokiyometrisinden oluşan oktamerik disk benzeri bir yapı oluşturur. Bu aşamada PVL hücre membranını geçemeyen pre-por yapısı meydana gelir. Daha sonraki aşamada tehlikeli olamayan bu pre-por yapısı, majör konformasyonel değişikliğe uğrayarak, kalsiyum iyonlarının geçişini sağlayarak hücre ölümüne yol açan tek bir transmembranöz por oluşumuna neden olur (56,96,100,103). (şekil 2.2)



Şekil 2.2 PVL tarafından gerçekleştirilen hücre intoksikasyon mekanizması. A) Salgılanmış, suda çözünür LukF-PV ve lukS-PV monomerleri membran yüzeyine bağlanır, B) heterodimerlere dönüşür, C) LukF-PV ve lukS-PV subunitleri heterotetramere oligomerize olur, D) Bu heterotetramerler, *lukS-PV* ve *LukF-PV* subunitlerinin 1:1 stokiyometrisinden oluşan disk benzeri oktametik pre-por yapıyı oluşturur, ve E) pre-por yapısı, majör konformasyonel değişikliğe uğrayarak, kalsiyum iyonlarının geçişini sağlayarak hücre ölümüne yol açan tek bir transmembranöz por oluşumuna neden olur (103)

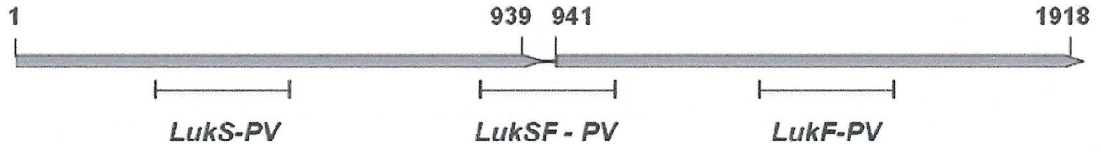
Monomerik formlarının kristal yapılarının 2.0 \AA olduğu tespit edilen *LukF-PV* ve *lukS-PV*, $\sim 70 \text{ \AA} \times \sim 35 \text{ \AA} \times \sim 25 \text{ \AA}$ moleküler boyutları ile benzer eliptik şekillere sahiptir (şekil 2.3). Bu yapılar biyolojik fonksiyonları için önemlidir (103). PVL'nin oligomerik üç boyutlu yapısı henüz belirlenmemiştir. Por formundaki heptamerik α -hemolizin iyi bilinen kristal yapısı PVL için emsal teşkil etmektedir. Fakat PVL ile α -hemolizin arasında önemli farklılıklar vardır. İlk olarak, heptamerik α -hemolizin kristal yapısı tek bir moleküler bileşenden, PVL ise iki bileşenden oluşur. Heptamerik α -hemolizin yapısında tek tip protein-protein ara yüzü, PVL'de ise iki farklı protein-protein ara yüzü bulunur. İkinci olarak α -hemolizin heptamerik halka yapısında bir araya gelirken; PVL'nin fonksiyonel formu oktametik halka benzeri yapıdadır (103,104). Bu yüzden iki toksinin kanal özellikleri farklıdır. PVL'nin pre-por konformasyonunu anlamak, *S. aureus* enfeksiyonunun erken aşamalarında antibiyotiklerin dizaynı için yol gösterici olabilir (103).



Şekil 2.3 *LukF-PV* ve *lukS-PV*'nin kristal yapıları (103).

LukF-PV ve *LukS-PV*, bikomponent toksin olan gama hemolizinden (*hgl*) farklı bir PVL lokusu tarafından eksprese edilir. İlk yapılan araştırmalarda, PVL genlerinin lizojenik bakteriyofaj Φ PVL genomunda lokalize olduğu bulunmuştur (26,105). İleri araştırmalarda *S. aureus* klinik izolatını, PVL üreten suşu dönüştürme yeteneği olan, PVL genini taşıyan Φ SLT (stafilokokal lökositolitik toksin), Φ PVL, Φ SA2MW ve Φ SA2usa fajları bulunmuştur. Bu *S. aureus* suşları arasında PVL genlerinin horizontal transferinin, PVL gen kümelerini bulunduran bakteriyofajlarla olduğunu göstermektedir (20,27,55,56,101,102).

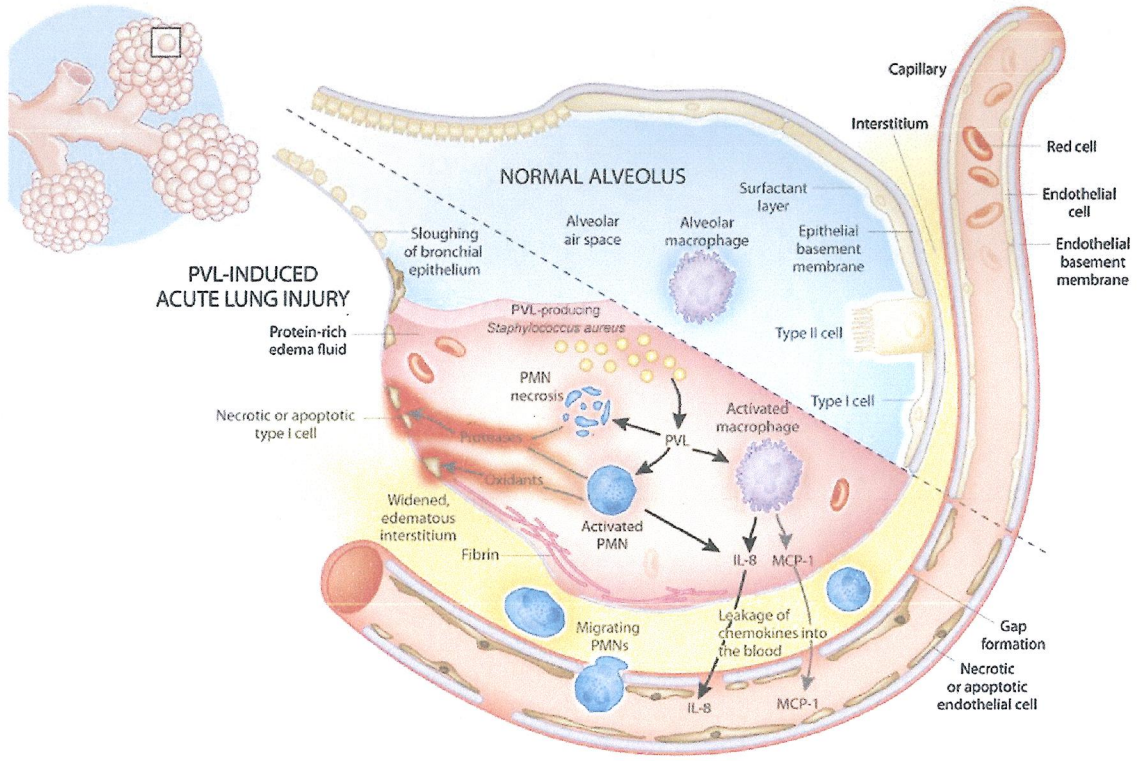
MRSA ve MSSA suşlarının her ikisinde de bulunabilen, tüm dünyada ciddi bir sorun olarak ortaya çıkan PVL; *S. aureus* kromozomuna entegre bir profaj segmentinde bulunan, iki bitişik ve ko-transkribe olan genler, *lukS-PV* ve *lukF-PV* tarafından kodlanır (96, 106). (Şekil 2.4)



Şekil 2.4 *LukS-PV* ve *lukF-PV* bölgelerinden oluşan *lukSF-PV* geninin yapısı (106).

PVL'nin S ve F komponentlerine ait tüm kombinasyonlarının sitotoksik etkisi doz bağımlıdır. Konsantrasyonuna bağlı olarak, PVL'nin oluşturduğu porlar ile sitokin salınımı, apoptozis ile hücre ölümüne veya nekroza neden olur. PVL intradermal olarak tavşana enjekte edildiğinde, doza bağlı olarak; ciltte eritem ve cilt nekrozuna neden olduğu görülmüştür. Özellikle, rekombinant PVL ile in vitro yapılan çalışmalarda değişik toksin konsantrasyonlarında nötrofillerdeki apoptozis ve nekrozun konsantrasyon bağımlı olduğu gözlenmiştir. PVL'nin mitokondri membranında por oluşturarak *B-cell lymphoma-2 associated X protein* (Bax) bağımsız farklı bir yol ile apoptozis oluşturduğu gösterilmiştir. Sublitik konsantrasyonlarda PVL'nin 6 saat içinde nötrofilde apoptozisin tetiklenmesine, yüksek toksin konsantrasyonunda ise bir saat içinde hücre parçalanmasına neden olduğu gözlenmiştir (20,107–109). (Şekil 2. 7)

Panton-Valentine lökositidin pozitif nekrotizan pnömoni klinik izolatlarında yapılan çalışmada; kollajen I, IV ve laminin gibi epitel bazal membranda bulunan, bağ dokusu ekstraselüler matriks moleküllerine (ECM) PVL'nin adezyonu artırdığı anlaşılmıştır. PVL'nin S komponentinin PMNL hücre yüzeyinde ganglioizid reseptörü GM1'e bağlandığı bildirilmiştir. Hasarlı solunum yolu epitelinde gelişen sekonder bakteri kolonizasyonu ve enfeksiyonunda merkezi bir rol oynayabildiği düşünülmektedir (20,110,111).



Şekil 2.5 PVL'nin neden olduğu akut Akciğer hasarı (110).

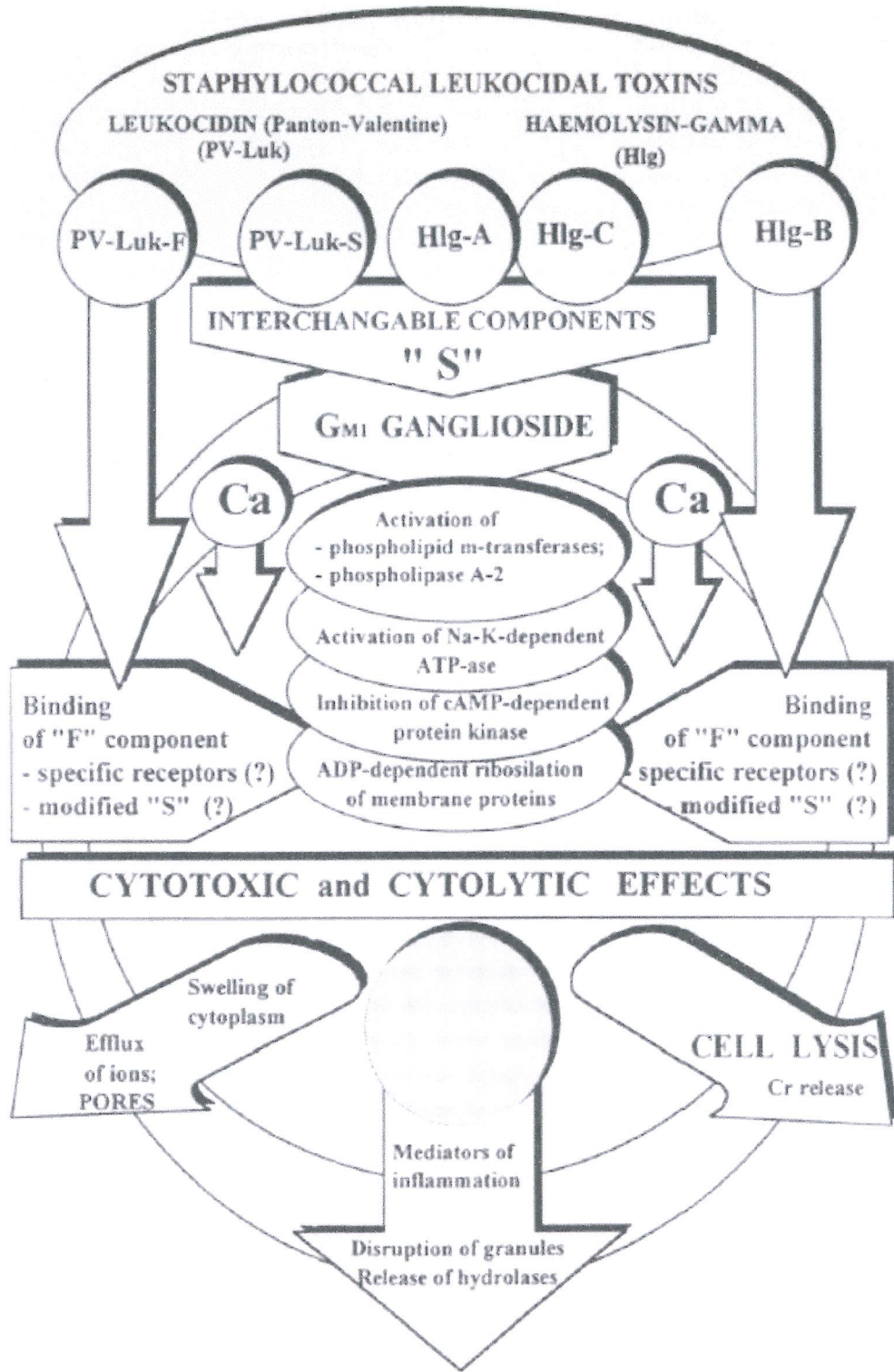
Fagositik hücrelerin hücre membranı, lökosal toksinlerin litik etkisi için birincil hedef bölgedir. GM1 gangliozidine S komponentinin bağlanması lökositin duyarlı hücrelerde por oluşumu ve lizise giden hücre membranında hasarının ilk basamağını oluşturur. S komponentinin bağlanması için ortamda Ca^{+2} iyonlarına (yaklaşık 1 mM) ihtiyaç vardır. Ayrıca bu olay konsantrasyona-bağımlı ve doyurulabilir. S-komponent-gangliozid kompleksi F-komponentini bağlayıcı bölgelerin sayısında artışa yol açan, fosfolipid metiltransferaz ve fosfolipaz A2 aktivasyonunu indükler (7,56,109–115).

Colin ve ark. yaptığı çalışmada; F komponentinin, in vitro koşullarda insan PMNL'lerine bağlanmasının doyurulabilir ve hücre başına yaklaşık maksimum 32000 molekül (2 nM) kapasitesi olduğunu göstermiştir (112). F komponenti için bağlanma bölgelerinin sayısı S-komponent gangliozid kompleksinin ADP-bağımlı ribozilasyonuna bağlı olup; fosfolipid metilasyon ve fosfolipaz aktivasyonu ile ilişkilidir. Lökosal toksinlerin S ve F komponentlerinin hücre membranında spesifik bölgelerine bağlanması; por oluşumu, intraselüler ürünlerin salınmasına

(örneğin lizozomlardan hidrolitik enzimler, spesifik granüller ve plazma) ve son olarak, hücre ölümü ve lizisi tetikler (Şekil 2.6). Hücre zarının spesifik bölgelerine bağlanarak PVL S+F kompleksi tarafından uyandırılan membranolitik olaylar dizisinde, membran hasarının derecesi, özellikle iki değerlikli iyon olan Ca^{+2} ve Zn^{+} ekstrasellüler konsantrasyona bağlıdır (112,113,116–120).

Bu toksin, hücre zarına zarar verdiği monovalan katyonlara duyarlı litik porlar oluşturmadan önce insan nötrofillerini aktive eder. Saflaştırılmış PVL enjeksiyonu insan bazofilik granüositlerinden histamin, nötrofil granüositlerden enzimler (örneğin β -glucuronidase ve lizozim gibi), kemotaktik faktörlerin (örneğin, lökotrien B4 ve interlökin 8 gibi) ve oksijen metabolitlerinin salınımını indükler (8,109,120).

PVL'nin S ve F bileşenleri ayrı ayrı test edildiği durumlarda sitotoksik değildir. Sitolitik etki sırasında PMNL'den salınan inflamatuvar mediatörlerin kinetiği detaylı incelendiğinde stafilokokal lökositidal toksinlerin potansi ağırlıklı olarak S bileşeni tarafından belirlendiği görülmüştür. S bileşeni sitolitik etkinin ilk basamağı hücre zarına bağlanmadan sorumludur. Ancak, membran hasarı, por oluşumu, PMNL granüllerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımı ve son olarak hücre lizisi, sadece F bileşeni tarafından tetiklenmektedir (56,108,109,112,120).

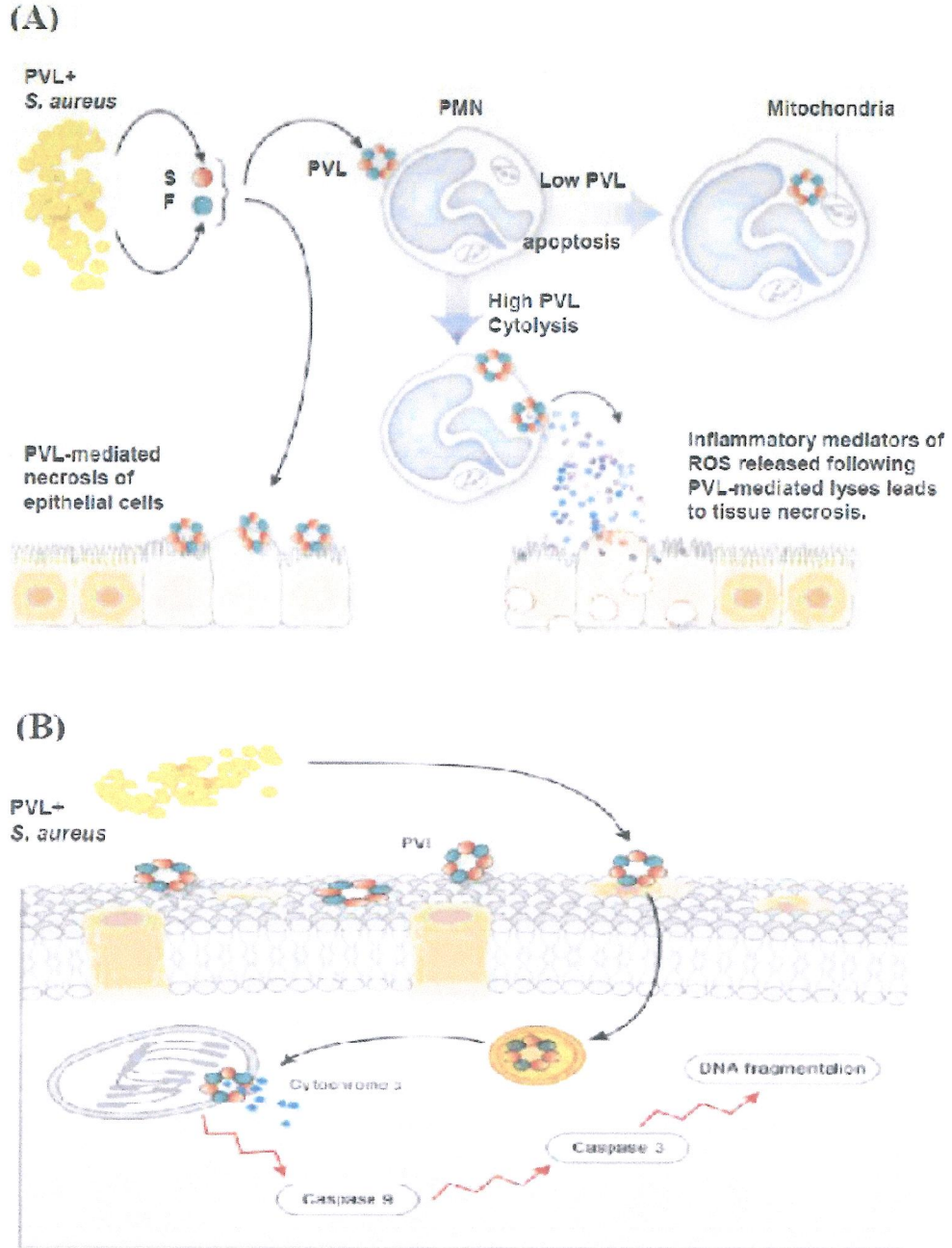


Şekil 2.6 Lökosidal toksinlerin hücresel etkileri (120)

Lökosidal etkiler üzerinde yapılan detaylı çalışmalarda; insan PMNL karşı PVL ve hgl'nin S ve F komponentlerinin farklı kombinasyonlarında S komponentleri farklı aktivitelere (lukS-PV> HlgB> HlgA) ancak F komponentlerinin LukF-PV ve HlgC'nin ise, benzer aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (109,120).

Panton-Valentine lökosidin pozitif *S. aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonların klinik seyri PVL-negatif olanlara göre daha şiddetli olma eğilimindedir. Örneğin, PVL pozitif *S. aureus* ile ilişkili pnömonide daha sık; sepsis, yüksek ateş, lökopeni, hemoptizi, plevral efüzyon ve ölüm görülmektedir (8,98). Ayrıca nekrotizan pnömonilerde nütropeni saptanması PVL'nin PMNL üzerine sitolitik etkilerini açıklamaktadır (8,121). Bir çalışmada immünkompetan genç hastalarda, PVL geni taşıyan *S. aureus* izolatları ile ölümcül hemorajik, nekrotizan pnömoni arasında ilişki tespit edilmiştir (8). Ayrıca, PVL üreten *S. aureus* suşları ve tekrarlayan fronkül, apse gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, nekrotizan pnömoni (yüksek mortalite ile), kemik ve eklem enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda vaka bildirilmiştir (122).

Hayvan çalışmalarında, tavşanlara saflaştırılmış intradermal PVL enjeksiyonu sonrasında; kapiller dilatasyon, kemotaksis, polimorfonükleer nütrofil (PMN) infiltrasyonu ve deri nekrozu ile birlikte şiddetli inflamatuvar lezyonlar gözlenmiştir (123).



Şekil 2.7 PVL'nin doku nekrozuna ait örnek model (7).

(A) Yüksek PVL konsantrasyonları nedeni ile PMNL lizisi ve reaktif serbest oksijen radikallerinin (ROS) salımına bağlı doku nekrozu meydana gelebilir. Alternatif olarak, lizize uğrayan PMNL'lerden ortaya çıkan granüllerde doku nekrozuna neden olabilir. (B) Düşük PVL konsantrasyonları sitokrom c ve caspaslar 9 ve 3 indüksiyonu yoluyla mitokondrial membran üzerinde PVL aracılı por oluşumuna neden olan yeni bir yoldan apoptozisi uyarabilir.

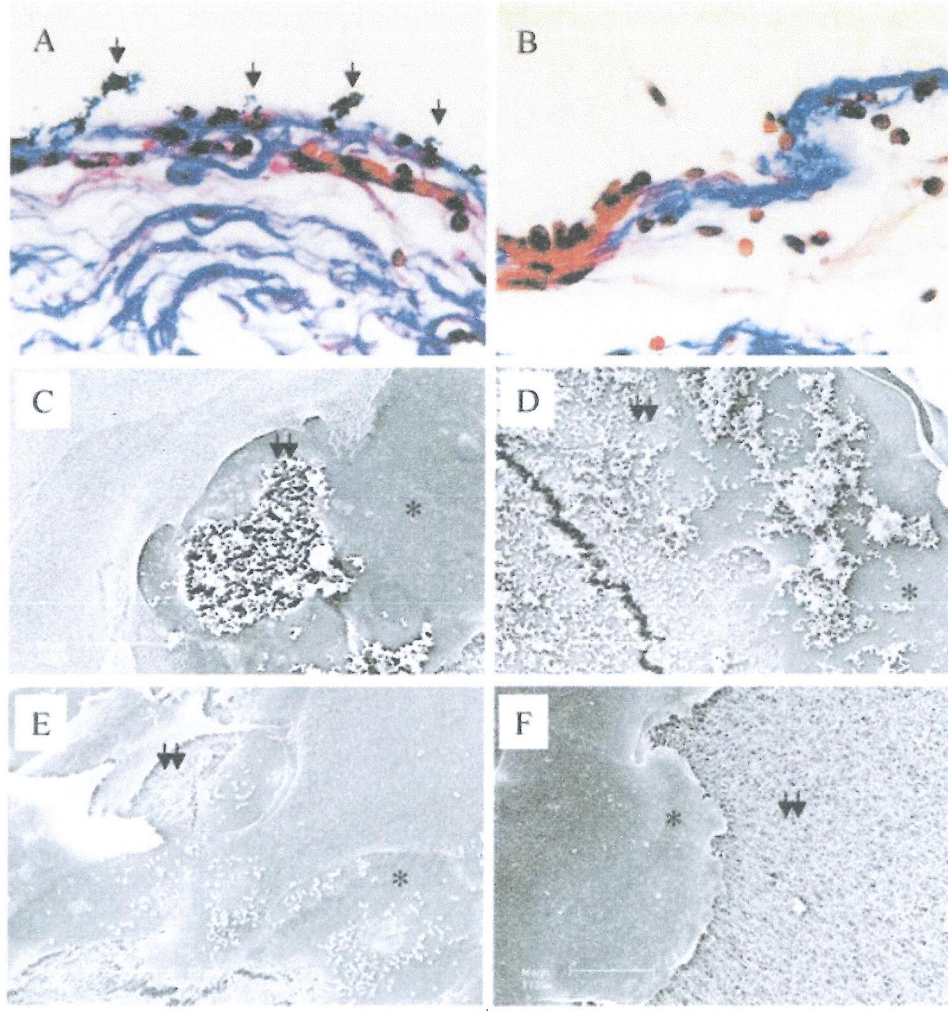
PVL'nin por oluşturan heptamer formu PMNL membranına etki etmeden önce, *lukS-PV* ve *LukF-PV* *S. aureus*'tan salgılanır. A) Yüksek PVL konsantrasyonları PMNL lizisine ve doku nekrozuna neden olur. B) Düşük PVL konsantrasyonlarda sitokrom c ve kaspas 9 ve 3 sistemi indüksiyon ile apoptozise neden olabilir (7).

PVL üreten suşlar; fronkül, kutanöz apseler ve şiddetli nekrotik deri enfeksiyonları ile ilişkilidir (30). Bir araştırmada PVL genlerinin; cilt enfeksiyonları ve toplum kökenli pnömoniye neden olan *S. aureus* suşlarında daha sık mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada toplum kökenli pnömonisi olan hastalardan izole edilen 27 *S. aureus* suşunun 23'ünde PVL geni tespit edilmiş olup; bunlardan 14 hasta ex olmuştur. Ölen hastalara yapılan otopside bilateral hemorajik nekrotizan pnömoni ve histolojik olarak çok sayıda kümeler oluşturan Gram-pozitif koklar ile trakeal mukoza ve alveoler septada nekrotik lezyonlar görülmüştür. Çalışmada ayrıca hastaların predispozan bir viral enfeksiyon geçirdiği, lökopenisi olduğu (PVL'nin bilinen bir etkisi), kan kültürlerinde *S. aureus* ürediği ve göğüs grafilerinde akciğerler üzerinde pnömatosel ve/veya yamalı infiltrasyonlar gözlenmiştir (99).

Gillet ve arkadaşları(8) PVL pozitif ve negatif *S. aureus* pnömonisi olan olguları karşılaştırarak yaptıkları çalışmada; PVL-pozitif hastaların (ortalama 15 yaş) negatif olan hastalara (ortalama 70 yaş) oranla daha genç olduğu, PVL-pozitif hastalarda; 39°C'nin üzerinde ateş, 140'ın üzerinde taşikardi, hemoptizi, pleural efüzyon ve lökopeni olduğunu gözlemişlerdir. Hastaneye yatıştan 48 saat sonra PVL-pozitif hastalar için mortalite oranı PVL-negatif hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. PVL-pozitif üç vakanın otopsisinde histolojik olarak interalveolar septalarda büyük hemorajik nekroz ile trakea ve bronş mukozasında geniş nekrotik ülserasyonlar gözlenmiş ayrıca PVL-pozitif olan hastaların % 75'inde grip benzeri enfeksiyonu takiben nekrotizan pnömoni gözlenmesini önemli bir klinik nokta olarak bildirmişlerdir. Gillet ve arkadaşlarının hipotezine göre viral akciğer enfeksiyonu, siliyalı ve sekretuar hücrelerde desquamasyona neden olarak bazal epitel hücrelere bakterilerin adezyonunu sağlamaktadır (8). PVL pozitif *S. aureus* suşlarının ve PVL-negatif *S. aureus* suşlarının ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanma özellikleri, insan solunum yolu epitel hücre kültürlerinde ve hasarlı insan

solunum yolları mukozası için karşılaştırıldığında; PVL-pozitif suşların hasarlı epitel için daha yüksek bir affiniteye sahip olduğu gözlenmiştir (8,20).

Yüksek organizma yoğunluğunda gen ekspresyonunun indüklediği, *S. aureus* ekzoproteinlerinin (PVL gibi toksinler ve enzimler de dahil olmak üzere) salınımı, quorum-sensing system agr (accessory gene regulator) tarafından kontrol edilmektedir (110). De Bentzman ve arkadaşlarının nekrotizan pnömoni oluşumundaki hipotezine göre; quorum-sensing mekanizması ile agr aktivasyonu tetiklenerek ekzoprotein üretiminin indüklendiği, ayrıca PVL pozitif *S. aureus* suşlarının tip I ve IV kolajen ve laminine yüksek afinitesinin hasarlı solunum yolu epiteline çok sayıda organizmanın adheransına yol açtığını ve PVL'nin doku hasarına katkıda bulunduğu ve lökosit yanıtını etkileyebildiği düşünülmüştür (110).



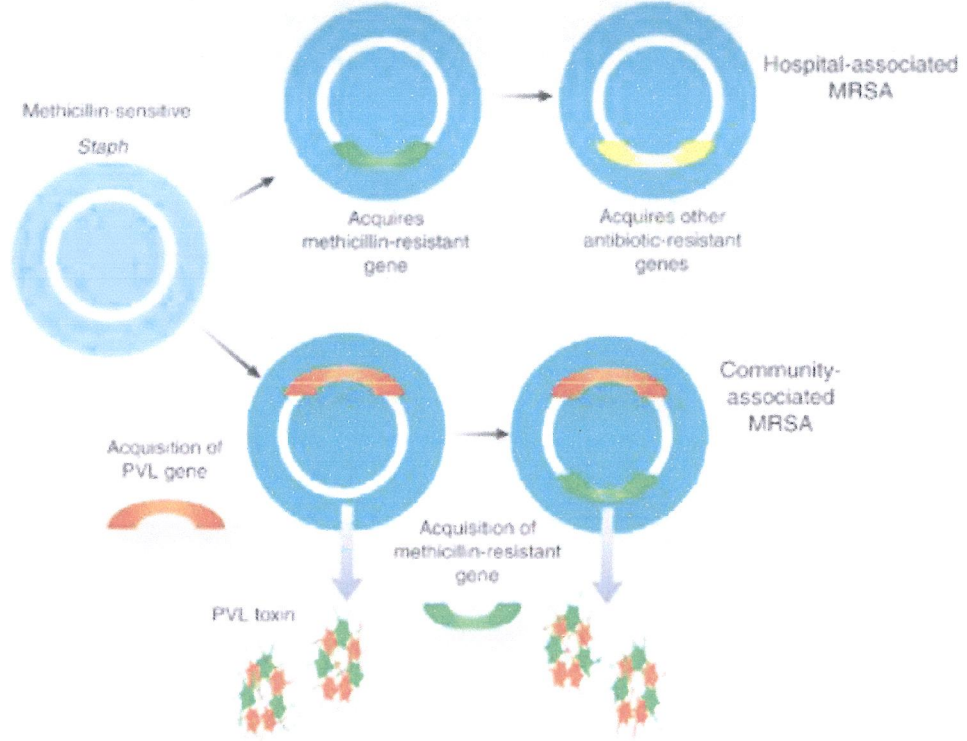
Şekil 2.8 Panton-Valentine lökositidin (PVL) pozitif ve PVL-negatif *S. aureus* suşları hasarlı insan solunum yolu dokusu (A ve B) ve insan solunum yolu epitel hücresi (HAEC) kültürü (C-F) in vivo ve in vitro testleri. A PVL pozitif, B PVL negatif *S. aureus* suşları. C ve F PVL pozitif, D ve E PVL negatif insan solunum yolu epitel hücresi (HAEC) kültürü (110)

Panton-Valentine lökositidin'in potansiyel etkileri göz önüne alındığında, PVL genine sahip toplum kökenli metisiline dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) suşları, tüm dünyada *S. aureus* enfeksiyonlarında büyük bir öneme kavuşmuştur. Bu enfeksiyonlara MRSA gibi risk faktörleri olmadan, toplumdan edinilmiş *S. aureus* suşlarında neden olabilmektedir. Baba ve arkadaşları Kuzey Dakotadan (MW2 olarak belirlenen) izole edilen bir TK-MRSA suşunda, yeni küçük bir varyant metisiline direnç lokusunun (SCCmec IVa) tüm genom dizilimini ve PVL lokus varlığını tespit etmiştir (73). Amerika Birleşik Devletleri, Fransa, İsviçre, Avustralya, Yeni Zelanda da 117 TK-MRSA izolatında yapılan bir araştırmada, tüm TK-MRSA suşlarının tip

IV SCCmec kaseti ve PVL lokusu taşıdığı gösterilmiştir (98). San Francisco da yapılan çalışmalarda, cerrahi tedavi gerektiren ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen MRSA suşlarının %70'inin PVL taşıdığı bulunmuştur (124).

S. aureus için henüz lisanslı bir aşı yoktur. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan PVL-pozitif suşların giderek yayılması ve PVL toksininin neden olduğu potansiyel komplikasyonlar göz önüne alındığında, intravenöz immunglobulin (IVIg), nekrotizan pnömoni tedavisinde ek olarak kabul edilmiştir. PVL'ye karşı antikor içeren ticari IVIG formlarının rekombinant PVL'nin PMNL'lerde por oluşumunu ve sitopatik etkisini nötralize ettiği gösterilmiştir. IVIg bu inhibitör etkisi için olası mekanizmalar, antijen-spesifik antikorlar ve PMNL reseptörlerindeki non-spesifik blokaj olabileceği düşünülmektedir. IVIg'in tek başına veya protein sentezini inhibe eden bir antibiyotik ile birlikte kullanımı PVL ekspresyonunu azaltarak, potansiyel sitotoksik etkileri azaltmaktadır (114). Pürifiye PVL komponentleri ile immünizasyon sonucu PVL'ye bağlı dermonekroz'a karşı kısmen koruma sağlanmıştır. Bu veriler ışığında daha ileri çalışmalar ile anti-PVL antikorlarının tedavide kullanımı belki de PVL karşı bir aşı gelişimini sağlayabileceği kanısındayız.

2.6.1 Toplum Kökenli Metisilin Dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) ve Hastane Kökenli Metisilin Dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) Suşların Epidemiyolojisi:



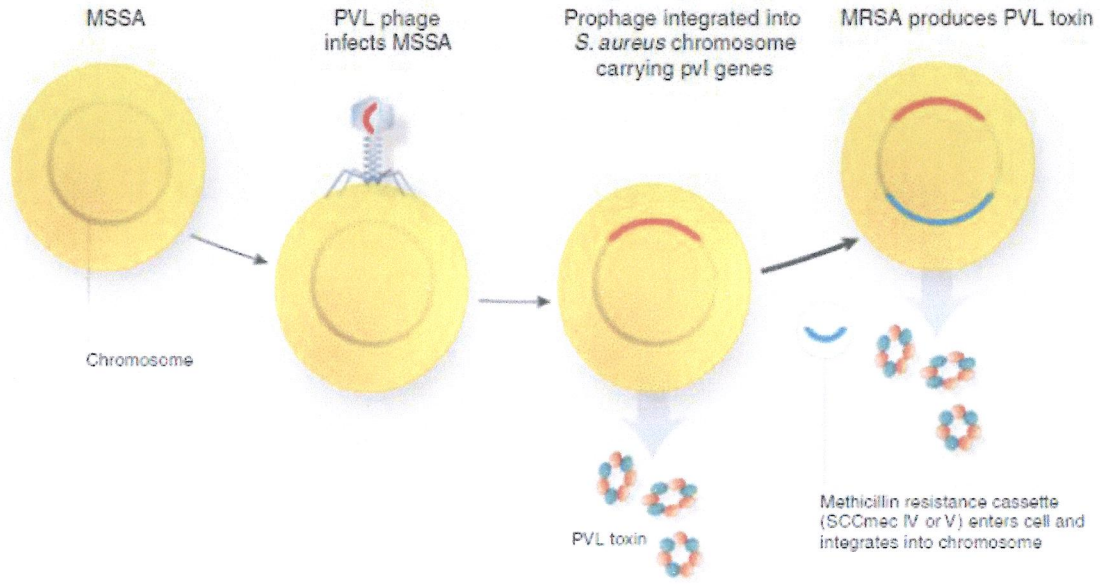
Şekil 2.9 Toplum Kökenli ve Hastane Kökenli MRSA oluşumu (7).

1990'lı yıllardan önce MRSA suşlarının sadece hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu sanıldığından, TK-MRSA suşlarının önceleri hastaneden, topluma yayılan nozokomiyal suşlar olduğu düşünülmekteydi. HK-MRSA ve TK-MRSA arasındaki genotipik farklılıkların keşfi, TK-MRSA suşlarının toplumda bulunan endemik MSSA suşlarından evrimleştiğinin kabulüne yol açmıştır. HK-MRSA izolatlarının TK-MRSA suşlarından ayırt etmede üç büyük genotipik belirteç; Genetik soy, metisilin direncini taşıyan genetik yapı ve PVL varlığıdır (7,125).

Hastane kökenli MRSA genellikle büyük stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC*mec*) tip I, II veya III (34–67 kb) taşımaktadır, fakat TK-MRSA izolatları yeni

tarif edilen küçük SCCmec tipleri: tip IV (24 kb), ya da daha az sıklıkta görülen SCCmec V veya varyant V_T taşımaktadır. Büyük boyutlu olan SCCmec II ve III, sıklıkla SCCmec IV ve V'te olmayan β-laktam antibiyotiklere karşı direnç genlerini genelde bulundurmaktadır. TK ve HK-MRSA arasındaki bir diğer önemli genetik farklılık ise TK-MRSA suşlarında PVL genlerini taşıyan, entegre bir bakteriyofaj (phiSLT) varlığıdır (7,126–129). Epidemiyolojik ve klinik veriler, TK-MRSA suşlarının yüksek virülans potansiyelinin PVL kodlayan genlerin varlığı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (8,98). Örneğin Lina ve ark.(99) ile Gillet ve ark.(8) çalışmalarında PVL pozitif *S. aureus* suşları ile şiddetli yara enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoniler arasında ilişki rapor etmiştir. PVL, *S. aureus*'lar da yaklaşık %5 oranında bulunmasına karşın, TK-MRSA'larda yaklaşık %90 oranında bulunmaktadır (130). PVL; SCCmec tip I, II ve III varlığı ile değil yaygın olarak SCCmec IV ve sporadik olarak SCCmec V_T veya V ile ilişkilidir (7,126). 1970'li yıllarda ilk *Staphylococcus epidermidis*'te bulunmuş olan SCCmec IV, 1980'li yıllarda *S. epidermidis*'ten *S. aureus*'a transfer olmuştur (7,131). Çalışmalarda TK-MRSA suşlarında daha sık SCCmec tip IV geninin varlığı gösterilmiş, son yıllarda yapılan çalışmalarda tip V'in varlığı da saptanmıştır. SCCmec tip IV kaset genleri kısa ve küçük yapısı ile daha hareketli olup, plazmid veya bakteriyofaj ile diğer klonlara transfer olabilme özelliğine sahip olması nedeni ile stafilokoklar arasında kolaylıkla yayılabilmektedir. Bazı genetik çalışmalarda ise SCCmec tip IV geninin MSSA ya horizontal transferi gösterilmiştir (132–134).

Toplum kökenli MRSA orijinini açıklamak için kabul edilen güncel model; değişik coğrafi bölgelerde bulunan farklı birçok MSSA suşlarına PVL'yi kodlayan genlerinin lizojenik faj (phiSLT) ile alındığı, sonrasında küçük bir metisilin direnç kasetinin (örneğin, SCCmec IV), PVL pozitif MSSA suş genomuna bağımsız olarak entegre olduğudur. Böylece MSSA suşları, PVL pozitif olan MRSA haline gelmektedir (7, 135, 136). (Şekil 2. 10)



Şekil 2.10 *S. aureus* suşlarının PVL gen bölgesini kazanmaları (7)

Toplum kökenli metisiline dirençli *S. aureus*, altta yatan bir hastalığı bulunmayan yada uzun süre hastanede yatış öyküsü gibi herhangi bir risk faktörü taşımayan hastalardan izole edilebilmektedir. TK-MRSA'lar özellikle çocuklarda cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, invaziv hızlı ilerleyen nekrotizan pnömoni, sepsis, nekrotizan fasiit gibi enfeksiyon tablolarına neden olabilirler. Ayrıca yaygın damar içi koagülopatiyeye (DIC) yol açabilirler (137–140). Bazı bölgelerde, PVL lokusu içeren TK-MSSA suşlarına nazaran TK-MRSA suşları daha sık görülmektedir (132–134). Birçok toplumda, TK-MRSA suşları enfeksiyon etkeni olarak, artık HK-MRSA'larının yerini almaya başlamışlardır (96).

Multi lokus sekans tiplemesi (MLST) ve pulsed field gel electrophoresis (PFGE) teknikleri ile bölgesel olarak yaygın bulunan HK-MRSA suşlarının, TK-MRSA suşlarından genetik olarak farklı oldukları tespit edilmiştir (98,129,130,141). ABD'nde çoğu TK-MRSA suşu; tip IV SCCmec kaset tipi taşıyan ST1/USA 400 ve ST8/USA 300 olarak tanımlanırken, yaygın HK-MRSA suşları ise tip II SCCmec kaset tipi taşıyan ST5/pulsotip USA 100 veya ST36/pulsotip 200 (EMRSA–16)

olarak tanımlanmaktadır (121,135). Avrupa da ise ST8/USA 300, ST30 (okyanus klonu, USA1100) ve ST80 TK-MRSA suşları yaygınken, en sık rastlanan HK-MRSA suşu ST36/pulsotip 200 (EMRSA-16) olarak bilinmektedir. Kore ve Japonya da en sık ST5- MRSA-II klonlar bulunurken; diğer Asya ülkelerinde ST239 (veya ST241)-MRSAlII (veya IIIA) klonları daha yaygın olarak bulunmaktadır. TK-MRSA klonları coğrafi dağılımlarına göre isimlendirilmişlerdir. Örneğin ST80 Avrupada, ST8 ve ST1 Amerikada ve ST30 Okyanusyada saptanmıştır (142, 143).

Tablo 2.2 TK-MRSA ve HK-MRSA suşları arasındaki epidemiyolojik ve mikrobiyolojik özelliklerinin karşılaştırılması

	HK-MRSA	TK-MRSA
Etkilenen popülasyon	<ul style="list-style-type: none"> Hastanede yatanlar /bakım evi sakinleri, Yaşlılar, kronik hastalığı olanlar, Preterm neonataller, İmmün sistemi baskılanmış olanlar. 	<ul style="list-style-type: none"> Genellikle toplumdaki genç ve sağlıklı bireyler, HK-MRSA için herhangi bir risk faktörü taşımayanlar, Cezaevlerindeki, askeri personel, sporcular, Eşcinseller.
Enfeksiyon bölgesi	<ul style="list-style-type: none"> Bakteriyemi ve yara enfeksiyonları, Semptomatik solunum ve idrar yolları enfeksiyonları, Ventilasyon ilişkili pnömoni. 	<ul style="list-style-type: none"> Genelde cilt (apse ve selülit, fronkül) ve yumuşak doku enfeksiyonları, Şiddetli vakalarda, septik şok ve bakteriyemi, Nekrotizan pnömoni.
Risk faktörleri	<ul style="list-style-type: none"> Kalıcı cihazlar, kateter, Hemodiyaliz, Uzun süreli hastanede yatış, Uzun süreli antibiyotik kullanımı. 	<ul style="list-style-type: none"> Fiziksel temas, Yaralanmalar, Kötü toplumsal hijyen (örneğin, ortak havlu kullanımı).
Bulaşma	<p>a) Kişiden kişiye yayılım: sağlık personeli (örneğin hemşireler, doktorlar, cerrahlar, fizyoterapist, ziyaretçiler, hasta).</p> <p>b) Çevreden-hastalara yayılması (örn. hastane ekipmanları)</p>	<p>a) Kişiden kişiye yayılım: Ortak tesisler (örneğin spor ekipmanları, havlu, yüzme havuzları, vs.).</p> <p>b) Çevreden- kişilere yayılma (örn. paylaşılan spor malzemeleri)</p>
Antibiyotiklere duyarlılık	Sıklıkla çoklu dirence sahip	Genellikle HK-MRSA'ya oranla daha fazla antibiyotiğe duyarlı
PVL gen varlığı	Düşük (<5%)	Yüksek (>95%)
SCCmecA tipi	Ağırlıklı olarak I, II ve III	Temelde IV, V
Klonal tip	US300 ve 400	US100 ve 200

Hastane kökenli MRSA enfeksiyonları genelde cerrahiye bağlı enfeksiyonlar, pnömoni, sepsis, üriner sistem enfeksiyonu şeklinde görülürken TK-MRSA cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları veya pnömoni şeklinde görülmektedir (144). *Center for Diseases Control and Prevention (CDC)* TK- MRSA enfeksiyonuna neden olan

izolatları 2000 yılında inceleyerek bazı kriterler oluşturmuştur. (Tablo 2.3) CDC kriterleri doğrultusunda toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyon ayrımı genelde risk faktörü taşımayan hastalarda yatışın ilk 48 saati içinde üreme olup olmamasına göre yapılmaktadır (145,146). TK-MRSA demek için;

Tablo 2.3 TK-MRSA ayrımında CDC kriterleri (145)

TK-MRSA ayrımında CDC kriterleri
TK-MRSA enfeksiyonu tanısı koymak için: <ul style="list-style-type: none">• MRSA tanısı ayaktan tedavi sırasında yada hastaneye yatıştan sonra ilk 48 saat içinde MRSA pozitif bir kültür olmalı• Tıbbi geçmişinde MRSA enfeksiyonu ya da kolonizasyonu olmamalı• Son bir yıl içinde hiçbir tıbbi geçmişinde:<ul style="list-style-type: none">➤ Hastaneye yatış<ul style="list-style-type: none">• Huzurevinde kalma,• Diyaliz• Cerrahi• Kalıcı kateter veya transdermal tıbbi alet ile işlem öyküsü olmamalı

2.7 Moleküler Metotlar

Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak bulunması ve belirlenmesi zor veya mümkün olmayan enfeksiyöz ajanların tanımlanmasında, halen en değerli olanıdır. *S.aureus* suşları arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik epidemiyolojik araştırmalar için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), “pulsed field jel elektroforezi” (PFGE), kromozomal DNA restriksiyon analizi gibi genotipik özellikleri temel alan testler yapılmaktadır (147–150).

2.7.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR); bakteri, virüs gibi mikroorganizmalara ait hedef nükleik asit zincirlerini primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) ile in-vitro olarak hızlı bir şekilde çoğaltılmasını (amplifikasyonu) sağlayan oldukça güvenilir ve özgün bir moleküler yöntemdir. PZR ile hedef genetik materyal çok az sayıda olsa bile çoğaltılıp tanımlanabilmektedir (147–149).

PZR yönteminde temel olarak; öncelikle mikroorganizmanın ekstraksiyon işlemi ile nükleik asidi elde edilir. Nükleik asidin belirli bir bölgesine uygun olarak seçilmiş primer (primerler tipik olarak 18–20 bp büyüklüğündedirler ve amplifiye edilecek DNA dizisine komplementer diziler içerirler) kullanılarak hedef DNA parçası çoğaltılır (amplifikasyon). Amplifikasyon “thermal cycler” olarak isimlendirilen cihaz ile gerçekleştirilir. Amplifikasyon işleminde ilk basamak 94°C’de ısıtılan DNA’nın iki zincirinin birbirinden ayrılması, denatürasyondur. İkinci basamak birleşme (annealing) dir. Denatürasyon basamağında birbirinden ayrılmış olan kalıp DNA tek ipliklerine çoğaltılmak istenen DNA dizisine özgül iki primer, sıcaklığın (55-70°C’ye) düşürülmesi ile bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Optimum çalışma sıcaklığı 72°C olan *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazı, primerlerden başlayarak 5’-3’ yönünde DNA sentezi yapar. Üç basamaktan oluşan bu döngünün her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası iki katına çıkarılmış olur. Yani sentezlenen DNA bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve DNA parçaları geometrik olarak artarlar. Yaklaşık birkaç saat içinde gerçekleştirilen 30–40 döngü sonrasında hedef DNA parçasığı yaklaşık 10⁹ kat çoğaltılmış olur. Genellikle 0,5–2 kb büyüklüğünde amplikon adı verilen PZR ürünleri elde edilir. Agaroz jel elektroforeziyle amplikonlar ayrıştırılırlar ve bir nükleik asit boyası (örneğin en sık kullanılan etidyum bromid) ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenirler (147,148,150–152). Tezimizde *S. aureus* suşlarında PVL varlığını araştırmak amacı ile elde edilen PZR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

2.7.2 “Pulsed Field Gel Electrophoresis” Yöntemi

1984’te Schwartz ve Cantor tarafından geliştirilen “Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)” birçok patojen bakteri ve *S.aureus* suşlarının arasındaki genetik farklılıkları göstermek için kullanılan, agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonu olan önemli bir genetik tiplendirme metodudur. Birçok araştırmacı tarafından bu yöntem tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle, moleküler yöntemler içerisinde “altın standart” olarak kabul edilmiştir (147,153,154).

Normal agaroz jel elektroforezi ile ayrılamayan mega baz büyüklüğündeki (10 kb’den 1,5 Mb’a kadar) DNA parçalarının ayrımını, elektriksel alanın periyodik olarak (“pulsed”) yer değiştirdiği bu elektroforez yöntemiyle yapmak mümkündür. (147,153,154). PFGE yönteminde, “plug” adı verilen agaroz bloklar içine mikroorganizma gömülür, daha sonra enzimatik olarak hücre duvarı lizis yapılır. İzole edilen genom restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilir (147,155). *SmaI* kesim (restriksiyon) enzimiyle (CCCGGG tanıma dizisi) yaklaşık 2800 kilo baz (kb) büyüklükte olan stafilokok kromozomu kesildiğinde, büyüklüğü 10 ile 800 kb arasında 15–20 DNA parçasından oluşan bir band paterni ortaya çıkar (147,148). Bir görüntüleme sistemi yardımı ile oluşan band paternleri değerlendirilir.

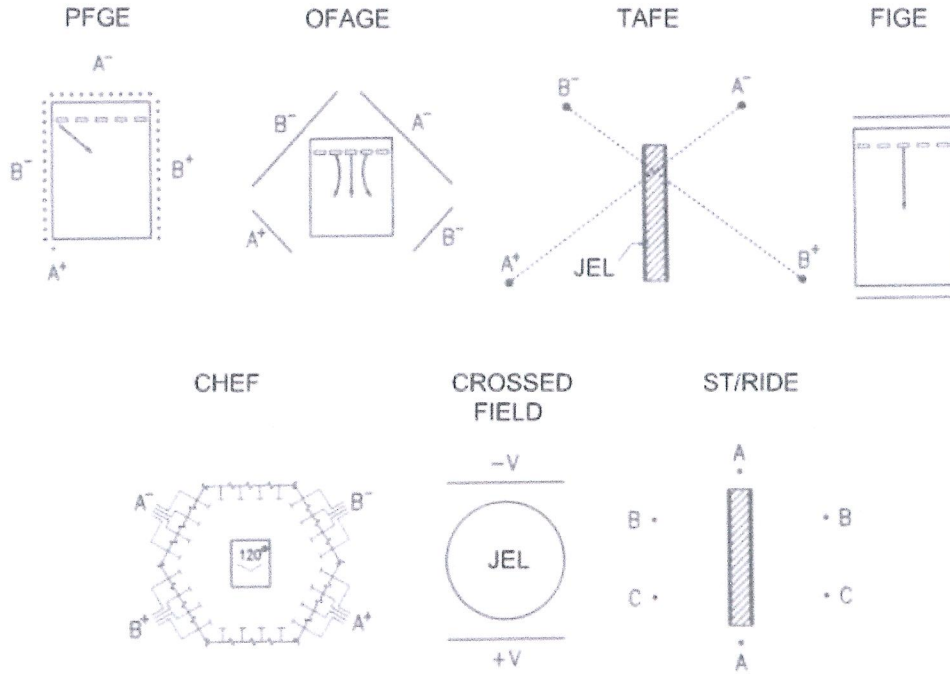
Çoğu laboratuvarlarda stafilokokların tiplendirilmesinde yüksek ayırım gücü, tekrarlanabilirlik gibi faktörler nedeniyle PFGE tercih edilen bir sistem haline gelmiştir ve günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir (147,150,156).

PFGE sonuçlarının yorumlanmasında son yıllarda Tenover ve arkadaşlarının önerdiği kriterler kullanılmaktadır (157). Bu kriterler;

- a) Aynı sayı ve büyüklükte bandlara sahip izolatlar “ayrıt edilemez”
- b) Üç band’a kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili”
- c) Dört-altı band farkı gösteren izolatlar “uzak ilişkili”
- d) Yedi ve üzeri band farklılığı gösteren izolatlar “ilişkisiz” olarak kabul edilirler.

Farklı merkezlerin PFGE sonuçları birbirleriyle uyum göstermemesine rağmen *S. aureus* tiplendirilmesinde PFGE yaygın ve etkin olarak kullanılan en iyi yöntemdir (147,151,156–161). PFGE'nin dünyada en yaygın kullanılan modeli Counter Clamped Homogenous Electric Field Electrophoresis (CHEF) dir. Bu yöntem dışında pulsed field gradient gel electrophoresis (PFGE), Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE), Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE), Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE), Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis (ST/RIDE), Field İnversion Gel Electrophoresis (FIGE) ve crossed field gel electrophoresis (Waltzer) gibi yöntemlerde kullanılabilir (162). (Şekil 2. 11)

Tezimizde; PZR ile PVL pozitif saptanan *S. aureus* suşları arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek amacı ile altın standart olarak kabul edilen PFGE uygulanmıştır.



Şekil 2.11 PFGE sistem çeşitleri (162).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hastalar ve *Staphylococcus aureus* izolatları

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında 2008–2012 tarihleri arasında izole edilen 88 toplum kökenli, 177 hastane kökenli olmak üzere toplam 265 *S. aureus* suşu çalışmaya alındı. *S. aureus* suşlarının izole edildiği hastalara ait klinik bilgiler ve laboratuvar sonuçları, defter kayıtlarından ve hastane bilgi sisteminden retrospektif olarak incelendi. Çalışmaya alınan izolatlar Skim Milk besiyerinde (Oxoid, Hampshire, England) -80°C'de (Heraeus, Hansu, Germany) stoklandı.

3.2 Kültür, Antibiyogram ve İdentifikasyon

Skim Milk besiyerinde stoklanmış olan *S. aureus* suşları; %5 koyun kanlı agara ekilerek, 35°C'de 18–24 saat inkübasyon sonrasında yeniden saf kültürleri elde edildi. Üreyen kolonilerin; koloni morfolojisi, pigment oluşumu, kanlı agarda β-hemoliz oluşturmaları, boyamada Gram pozitif kokların görülmesi, katalaz ve koagülaz deneylerinin sonucuna göre *S. aureus* olarak doğrulandı.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda, izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi için sefoksitin ve oksasilin diskleri kullanılarak Müller Hinton agar (MHA) besiyerinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi çalışıldı (163). Çalışmanın diğer aşamaları için saf olarak koyun kanlı agarda üretilen *S. aureus* suşları %1 gliserol içeren triptik soy buyyon besiyerinde -80°C' de saklandı.

3.2.1. Kullanılan Besiyerleri

a. Koyun Kanlı Agar

S. aureus suşlarının saf olarak elde edilmesi amacı ile koyun kanlı agar kullanılmıştır. (Oxoid.Ltd. Basingstoke, HantsEngland) (Himedia, Milano, Italy)

- Pepton (DIFCO 63928JB) 5gr
- Et ekstresi (MERCK 1.03979) 5gr
- NaCl (MERCK 1.06400) 5gr
- Agar (LAB M MC2) 12gr
- pH: 7.3 ± 0.2

37 gr toz besiyeri 1000ml distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakikada otoklavda (Trans, Ankara, Türkiye) steril edildi. Daha sonra 50°C'ye soğutulup içerisine %5–10 oranında defibrine koyun kanı eklenerek elde edildi.

b. Müller Hinton Agar

Müller Hinton agar metisilin direncini belirlemek amacı ile kullanılmıştır. (Himedia, Milano, Italy)

- Casein acid hydrolysate 17.5gr
- Beef heart infusion 2gr
- Storch, soluble 1.5 gr
- Agar 17gr
- pH: 7.3 ± 0.2

38 gram toz besiyeri 1000ml distile suda çözülerek 121°C' de 15 dakikada otoklavda steril edildi. Besiyerleri hazırlandıktan sonra en geç bir hafta içinde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.2 Suşların İdentifikasyonu

a. Katalaz testi

Stafilokokları katalaz enzimine sahip olmayan streptokoklardan ayırt etmek amacı ile kanlı agar besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonilerinden bir lam üzerine eküvyon yardımıyla dikkatlice alındı. Kolonilerin üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Stafilokokların katalaz enzimi ile hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşturması sonucu gaz kabarcıkları gözlemlendi (13,164).



b. Koagülaz testi

S. aureus'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan koagülaz deney yöntemlerinden; tüp koagülaz deneyi kullanıldı. Bu yöntem aşağıdaki sıra takip edilerek yapıldı (13,164).

1- Serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma, bir deney tüpü içerisine konuldu.

2- 24 saatlik inkübasyon sonrası kanlı agar besiyerinde üremiş olan stafilokok kolonilerinden bir koloni öze yardımı ile alınarak plazma içerisinde emülsifiye edildi.

3- Tüpler 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İlk dört saatte, her yarım saatte bir pıhtı oluşup oluşmadığına bakıldı. Pıhtı oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

4- İlk 4 saat sonunda pıhtı oluşmayan tüpler bir gece oda ısısında bekletildikten sonra yeniden değerlendirildi. Koagülasyon göstermeyen suşlar koagülaz negatif olarak kabul edildi (13,164).

3.2.3 Antibiyogram

3.2.3.1 Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Staphylococcus aureus olarak tanımlanmış 265 suşun metisilin direnci; *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)'ün belirlediği kriterler doğrultusunda Müller Hinton agar (MHA) besiyerinde, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin(30µg,Oxoid) ve oksasilin(1µg,Oxoid) diskleri kullanılarak belirlendi (163). Sefoksitin ve oksasiline direnç saptanan suşlarda, doğrulama testi olarak PZR ile 448bp'lik *mecA* gen bölgesinin varlığı araştırıldı.

3.2.3.2 Disk Difüzyon Testi

Disk Difüzyon yönteminin temeli, Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine bakterilerin yayılarak yapılan ekimi sonrasında, besiyeri yüzeyine antibiyotik emdirilmiş disklerin yerleştirilmesi ve 37°C'de bir gecelik inkübasyonun ardından disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarını ölçerek, mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığının incelenmesine dayanmaktadır (163, 164).

a. İdentifikasyonu yapılan *S. aureus* suşları öncelikle serum fizyolojikle süspanse edildi ve bulanıklığı McFarland 0,5'e göre ayarlandı.

b. Bulanıklığı ayarlanan bakteri süspansiyonu eküvyon aracılığı ile Müller-Hinton besiyerine ekildi.

c. Besiyeri üzerine Oksasilin (1µg,Oxoid) ve Sefoksitin(30µg,Oxoid) diskleri steril pens ile yerleştirilerek 37°C'de 18–24 saat inkübasyona bırakıldı.

d. İnkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek CLSI kriterleri doğrultusunda metisilin direnç profilleri belirlendi. Standart suş olarak ATCC 25923 kullanıldı.

Tablo 3.1 Oksasilin ve Sefoksitin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri (CLSI) (163)

	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
1µg Oksasilin	≤ 10 mm	11–12 mm	≥ 13 mm
30µg Sefoksitin	≤ 21mm		≥ 22mm

3.3 *LukS/F-PV* ve *MecA* Gen Bölgelerinin Araştırılması

Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşların da 448bp'lik *mec A* ve 433bp'lik *LukS/F-PV* gen bölgelerinin araştırılması amacı ile DNA kalıp olarak kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine, agaroz jel elektroforezi uygulandı.

3.3.1 Suşların DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için otomatize (BioRobot EZ1 system, QIAGEN, Hilden, Germany) sistem kullanıldı.

Kit İçeriği

- RCV (Reagent Cartridges, Virus)
- DHT (Disposable Filter-Tips)
- DFT (Disposable Filter –Tips)
- ST Sample Tubes (2ml)
- ET Elution Tubes (1.5ml)
- Carrier RNA
- AVE Elution Buffer

Ekstraksiyona alınacak örnek miktarı 200 µl olarak belirlendi. Son volüm 60 µl olarak sulandırıldı ve çalışmalara alınım süresine kadar -20°C' de saklandı.

3.3.2 PZR ile Hedef Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

A) *LukS/F-PV* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Toplum ve hastane kökenli olmak üzere; 86 MRSA ve 179 MSSA toplam 265 *S. aureus* suşundan elde edilen ekstraksiyon ürünlerine Lina ve arkadaşları (99) tarafından tanımlanan 433 bp'lik ürün oluşturan *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası PVL'yi kodlayan *lukS/F-PV* gen bölgesinin varlığının belirlenmesi amacı ile agaroz jel elektroforezi uygulandı.

Tablo 3.2 PVL varlığını belirlemek için kullanılan primer dizileri

PVL için kullanılan primerler	
<i>Luk-PV-1F</i> (Forward Primer)	5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3'
<i>Luk-PV-2R</i> (Reverse Primer)	5'- GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC- 3'

Tablo 3.3 2X Amplifikasyon tamponunun hazırlanması

2X Amplifikasyon tamponunun hazırlanması	
10 X Buffer	200 µl
25Mm MgCl	120 µl
1.5 Mm Dntp	25 µl
H ₂ O	655 µl

Tablo 3.4 PVL varlığını belirlemek için kullanılan PZR Amplifikasyon mastermiks protokolü

PZR Amplifikasyon mastermiks protokolü	
2X PZR Buffer	12,5 µl x örnek sayısı
1F Primer	1 µl x örnek sayısı
1R Primer	1 µl x örnek sayısı
Taq DNA Polimeraz	0.3 µl x örnek sayısı
Distile Su	7,7 µl x örnek sayısı

Amplifikasyon miksi hazırlandıktan sonra 0,2 ml tüplere 22,5 µl dağıtıldı. toplam hacim 25 µl olacak şekilde bakteri DNA ekstraksiyon ürünlerinden tüplere 2,5 µl dağıtılıp termal döngü cihazına (Palm-cycler Corbett Research, Australia) yerleştirildi.

Tablo 3.5 *LukS/F-PV* için Amplifikasyon Şartları

Evre	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Ön denaturasyon	94°C	5 dakika	1
Hedef DNA denaturasyon	94°C	30 saniye	30
Primer bağlanması	55°C	30 saniye	
Primer Uzaması	72°C	60 saniye	
Final uzama	72°C	5 dakika	1

Amplifikasyon işlemi sonrası ürünler,%2'lik agaroz jele yüklendi.

B) *Mec A* Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Sefoksitin ve oksasilin diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile metisiline direnç belirlenen *S. aureus* suşlarında doğrulama testi olarak PZR ile *mecA* gen varlığı araştırıldı.

Tablo 3.6 *MecA* varlığını belirlemek için kullanılan primer dizileri

<i>mecA</i> primerleri	
Primer 1F	5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C- 3'
Primer 2R	5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C- 3'

Amplifikasyon miksi hazırlandıktan sonra 0,2 ml tüplere 22,5 µl dağıtıldı. toplam hacim 25 µl olacak şekilde bakteri DNA ekstraksiyon ürünlerinden tüplere 2,5 µl dağıtılıp termal döngü cihazına (Palm-cyclers Corbett Research, Australia) yerleştirildi.

Tablo 3.7 *MecA* için Amplifikasyon programı

Evre	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Ön denaturasyon	94°C	4 dakika	1
Hedef DNA denaturasyon	94°C	45 saniye	30
Primer bağlanması	50°C	45 saniye	
Primer Uzaması	72°C	1 dakika	
Final uzama	72°C	2 dakika	1

3.3.3 Hedef Gen Bölgelerinin Görüntülenmesi

A) Agaroz Jel Elektroforezi

Deniz yosunlarından elde edilen agaroz, 42-45°C'ye soğutulduğunda karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile katılarak jel yapısı oluşur. Oluşan bu jelle yüklenen DNA molekülleri, elektroforez cihazı yardımı ile molekül ağırlıklarına, yapılarına, elektron yüklerine göre farklı hızda hareket ederler. Bu harekete göre küçük molekül ağırlığına sahip DNA bantları daha büyük olanlara göre daha hızlı bir şekilde hareket ederek farklılaşır.

Agaroz Jelin Hazırlanması İçin Gereken Malzemeler

- Agar(SeaKem Le Agarose)
- Trizma Base(SIGMA)
- EDTA(AppliChem)
- Borik Asid(AppliChem)
- Distile Su
- Etidyum Bromid (0,5mikrogram/mililitre)

1X TBE Buffer(Tris-Boric Asit-Edta) Hazırlanması

1000 ml için;

- Trizma Base=10,78 gram
- Borik asit=5,5 gram
- EDTA=0,75 gram

Karışım hazırlandıktan sonra distile su ile hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

Agaroz Jelin Hazırlanması

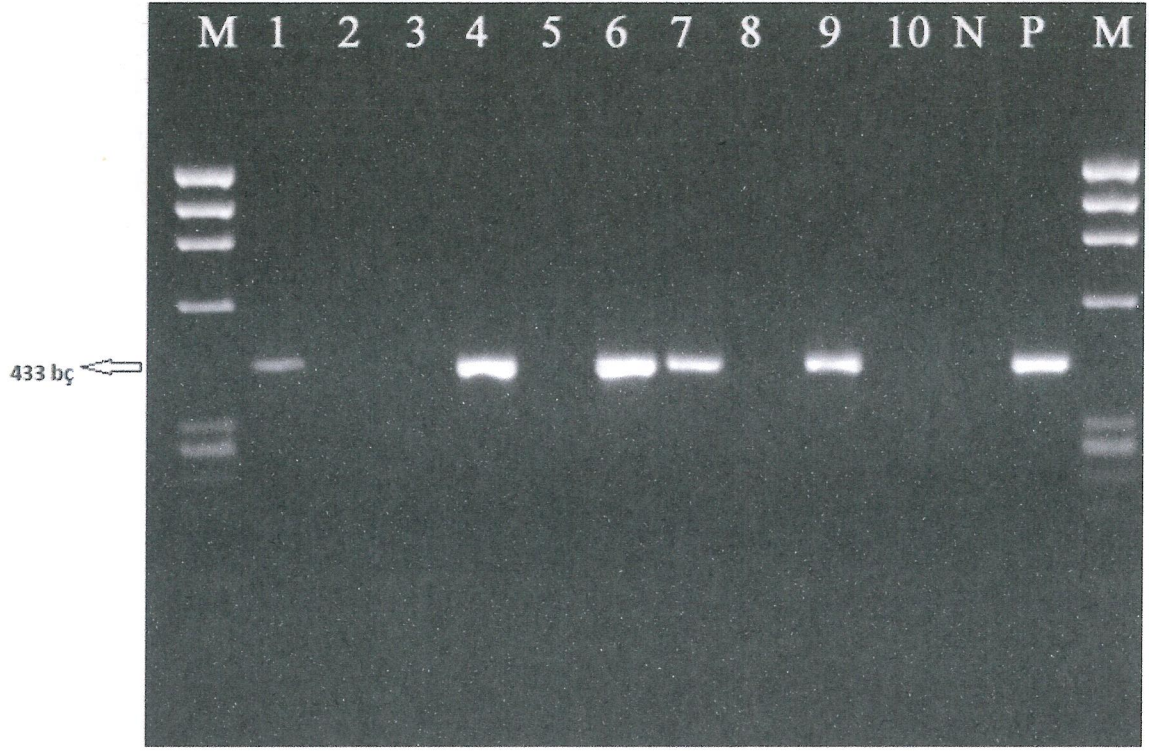
Hassas terazide 3 gram agar, %2'lik 150 ml agaroz jel için tartıldı. Balon jojeye bırakıldı. 150 ml 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında agar tamamen çözününceye kadar eritildi. Oda şartlarında yaklaşık 50–60°C'ye kadar soğuyan agaroz jel üzerine 10µg/ml konsantrasyonda Etidyum Bromür'den 20µg/ml eklendi. (Etidyum Bromür çift iplikçikli DNA arasındaki H bağları ile kompleks oluşturarak UV altında florasan ışıma sağlamaktadır.) Etidyum bromür ile agaroz jel karıştırıldıktan sonra elektroforez jel kalıba dökülerek soğumaya bırakıldı. Oda ısısında katılaştıktan sonra dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve içerisinde 1xTBE (Tris, Borik asit ve EDTA) tamponu olan tank içerisine yerleştirildi.

B) Elektroforez

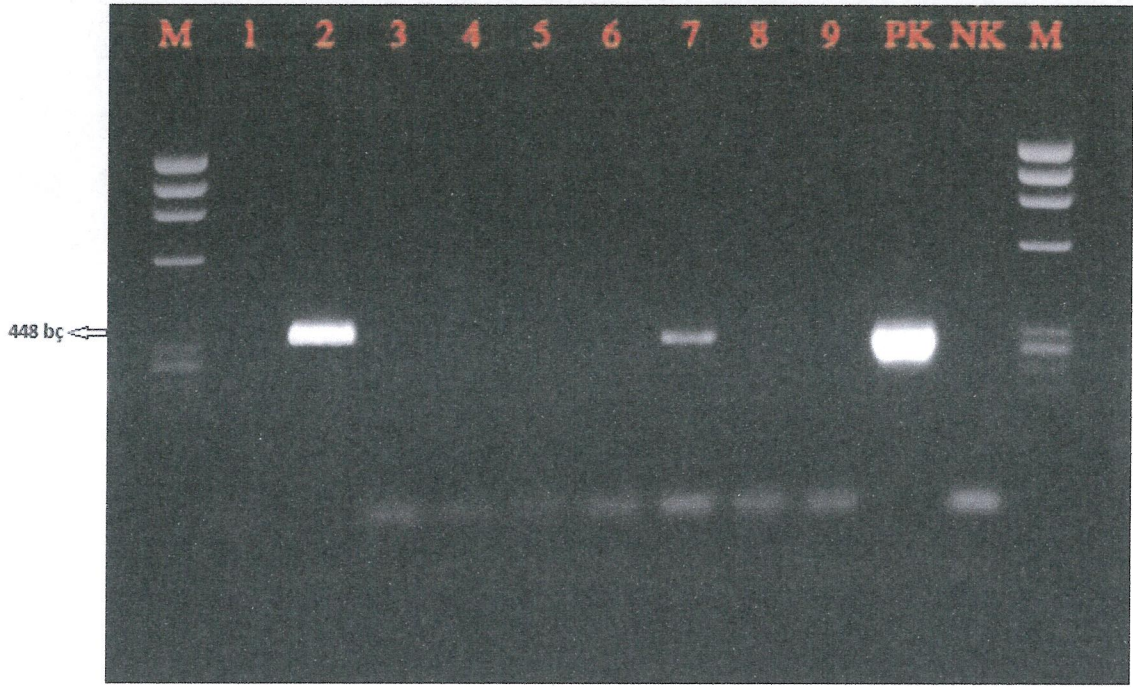
Agaroz jel katılaştıktan sonra, amplifikasyon ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için; 10 µl amplifikasyon ürünü ile 3 µl blu dye boya karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. Örnekleri doğru bir şekilde değerlendirebilmek için molekül büyüklükleri bilinen marker DNA'lar jelde yer alan bir kuyucuğa yüklendi. Marker ve örneklerin yüklenmesinden sonra tank güç kaynağına (Biorad) bağlandı. Elektroforez cihazında (Stratagene) 100 volt elektrik akımına tabii tutularak moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı.

C) Jel Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elektroforez sonunda görüntüleme için (Gel logic 2200 imaging system, ayırım gücü 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) sistemi kullanılarak DNA bantları incelendi. Elde edilen 433 bp'lik DNA fragmentleri *luxS/F-PV* gen bölgesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3. 1). Elde edilen 448bp'lik DNA fragmentleri *mecA* geni pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3. 2).



Şekil 3.1 Jel elektroforezde *lukS/F-PV* gen bölgesi sonuçlarının görünümü. 2,3,5,8,10. örnekler; *lukS/F-PV* negatif, 1,4,6,7,9. örnek; *lukS/F-PV* pozitif, N; negatif kontrol, P; *lukS/F-PV* pozitif kontrol (433 bç), M; 1 kb DNA Ladder (Promega)



Şekil 3.2 Jel elektroforezde *mecA* sonuçlarının görünümü. 2,7. örnekler; *mecA* pozitif, 1,3–6,8,9. örnekler; *mecA* negatif, NK; negatif kontrol, PK; *mecA* pozitif kontrol (448 bç), M; 1 kb DNA Ladder (Promega)

3.4 *LukS/F-PV* Gen Bölgesi Pozitif Olarak Değerlendirilen Suşların Genotiplendirilmesi

3.4.1 PFGE Yönteminin Uygulanması

PVL pozitif bulunan 6 hastane, 13 toplum kökenli, toplam 19 *S. aureus* suşu arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacı ile PFGE yöntemi uygulandı. PFGE yöntemi Durmaz ve arkadaşlarının modifiye ettikleri protokole göre yapıldı (165).

A- İzolatların hazırlanması

1. *S.aureus* suşları kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.

3. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı.

4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1ml hücre süspansiyon tamponu(HST) (10Mm Tris-HCL,50 Mm EDTA, 20 mM NaCl, ph 7.2) içinde süspanse edildi.

5. Hücre süspansiyonu, 2500 x g'de 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilerek, santrifüj sonrası üstteki HST atıldı.

6. Pelletin üzerine tekrar 1ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı.

7. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer. Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm' de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu agaroz gömülecek zamana kadar +4°C derecede bekletildi.

B-İzolatlardan agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz(Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlandı.

- 0.20 g agaroz, 20 ml'lik balona kondu.
- Üzerine 9.80 ml HST eklenerek, yavaşça karıştırılıp agarın erimesi sağlandı.
- Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu. Çıkarılıp hafifçe karıştırıldıktan sonra tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırınında tutuldu. Bu işlem agaroz iyice çözülünceye kadar tekrarlandı.
- Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu.
- Ependorf tüplere, 150µl dağıtılarak ve 45-50°C'deki kuru ısı bloğunda bekletildi.

2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu.

3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150µl alınarak 50°C'de tutulan ve içerisinde 150µl düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi. Üzerine 2µl lizostafin (1 mg/ml distile) eklenip, birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.

4. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Bio Rad Laboratories) dağıtıldı.

5. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

C. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre parçalama tamponu-1 [10 mM Tris-HCL(pH 7.2)-50 mM NaCl-50 mM EDTA-0.2% sodyum deoksikolat-0.5% sarkozil] konuldu.

2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi.

3. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

4. Parçalanma tamponu dökülerek, yerine 0,5 ml hücre parçalama tamponu-2 [250 mM EDTA(pH 9,0)-1% sarkozin, 50 mg/ml proteinaz K] konuldu.

5. 50°C' de yarım saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

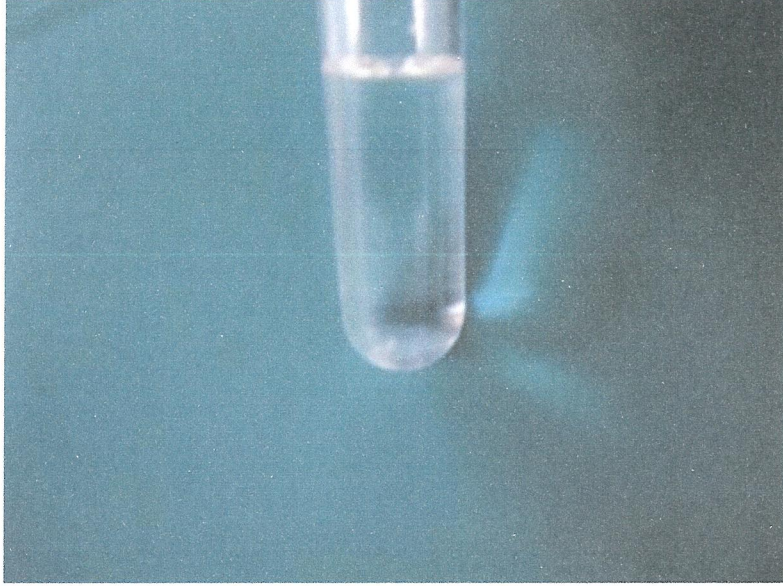
D- Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler +4°C'de 30 dakika bekletildi.

2. Dikkatlice PK solüsyonu aspire edildi.

3. Agaroz kalıplar üç defa (her biri 50°C’de 30 dakika olmak üzere), 4 ml TE[10 Mm Tris-HCL(ph 7.6)-0.1 mM EDTA] tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrası agaroz kalıplar şeffaflaştı.

4. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi(RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu (Resim 3. 1).



Resim 3.1 Yıkama sonrası agaroz kalıplar

E-Agaroz kalıpları içindeki DNA’nın RE ile kesilmesi:

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistürü yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x Smal tamponu (Promega Corporation, WI, USA) içine konularak çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 10 dakika bekletildikten sonra sıvı aspire edildi.

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

- 10 µl 10x Smal tamponu
- 1 µl BSA (10 mg /ml)
- 2,5 µl Smal enzimi(10 U/ml) (Promega Corporation, WI, USA)
- 86,5 µl steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)
- Toplam hacim 100 µl

3. Bu karışımın içerisine enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 2 saat inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

F-Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0,5 x TBE(44.5 Mm Trisma base,44.5 Mm Borik asit 1 mM EDTA, pH 8.4) içinde 100 ml olacak şekilde %1’lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

i. 1 g ’’pulsed-field certified agarose’’ 200 ml’lik balona konuldu.

ii. Üzerine 100 ml 0,5 x TBE eklenip, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

iii. Alüminyum folyo ile ağzı kapatılan balon mikrodalga fırında tutularak agarın erimesi sağlandı.

iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50°C’lik su banyosuna konuldu.

2. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulan kasete agaroz dökülerek hazırlandı.

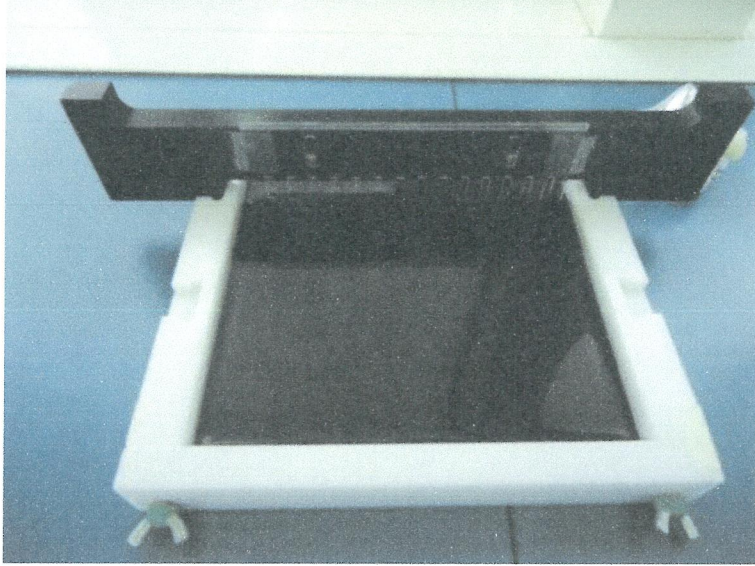
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirildi.

4. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45–50°C olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü (Resim 3. 2).

6. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldıktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.

7. Agaroz kasetinin çerçevesi çıkarılarak tabla üzerindeki agaroz; içerisinde 1900–2000 ml 0,5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

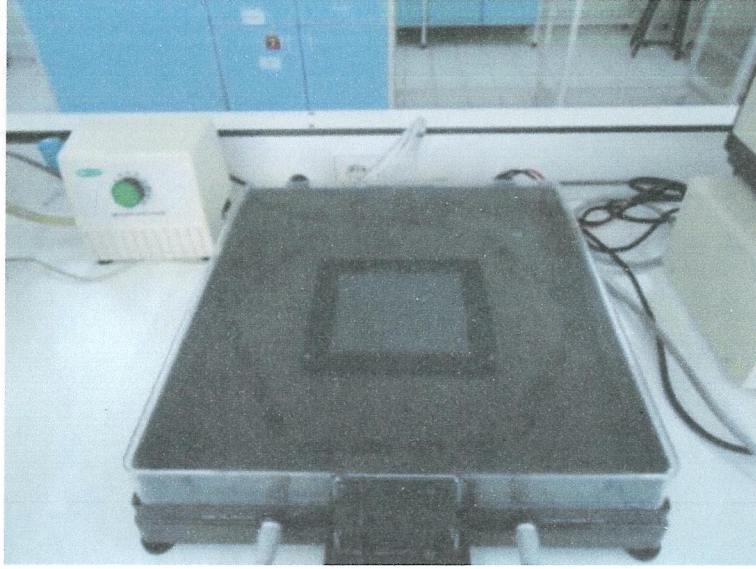


Resim 3.2 Kaset içine dökülen agaroz

G- Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları hazırlandı:

Başlangıç vuruş süresi 5,3 sn, bitiş süresi 34,9 sn, vuruş açısı 120, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat (Resim 3. 3).



Resim 3.3 CHEF-DR II sistem (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium)

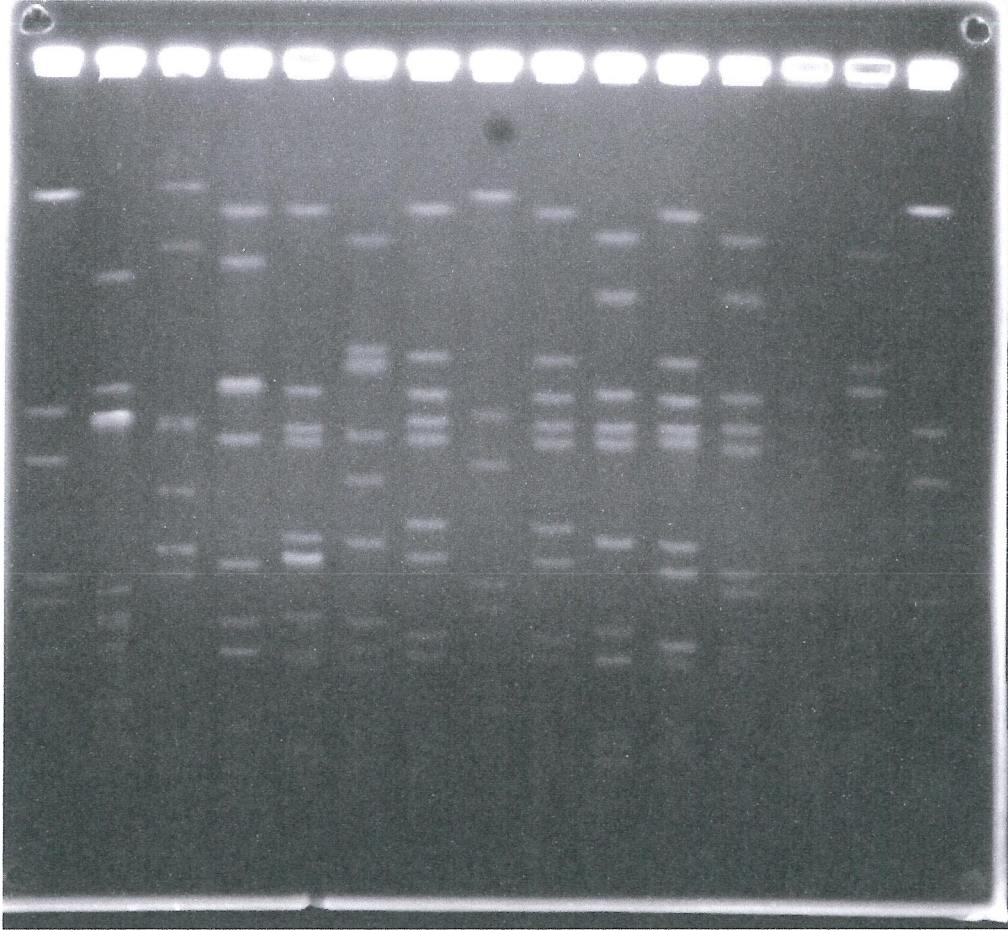
H-Sonucun gözlenmesi ve analizi

1. Elektroforez sonrası jel, 5 mg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınarak 20 dakika boyandı.
2. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü:1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bantları görüntülendi (Şekil 3. 3).
3. GelCompar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem,Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

Öncelikle her resimde bulunan standart suşlar (1,8,15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin, denrogramı oluşturulup kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1–1.5 olarak alındı. PFGE profilleri Tenover kriterlerine göre yorumlandı (157).

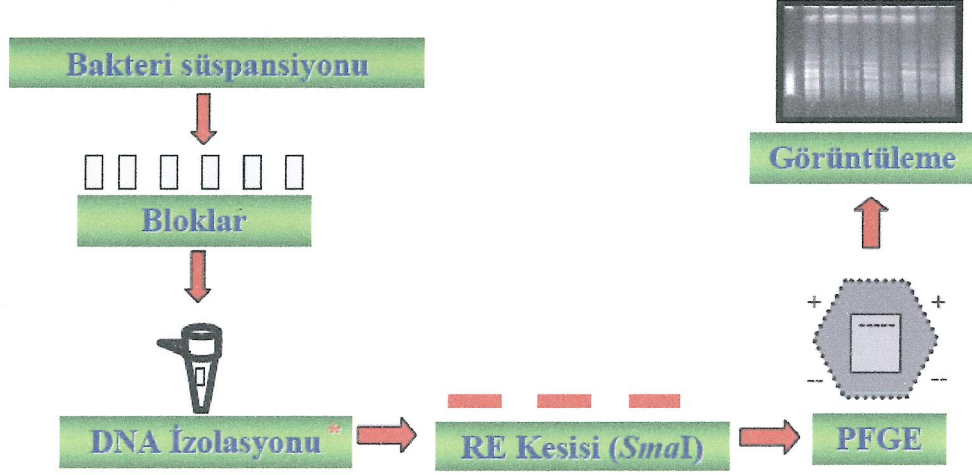
Bu kriterler;

- a) Aynı sayı ve büyüklükte bandlara sahip izolatlar “ayır edilemez”
- b) Üç band’a kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili”
- c) Dört-altı band farkı gösteren izolatlar “uzak ilişkili”
- d) Yedi ve üzeri band farklılığı gösteren izolatlar “ilişkisiz” olarak kabul edilirler.



Şekil 3.3 PFGE sonrası DNA bant görüntüleri

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)



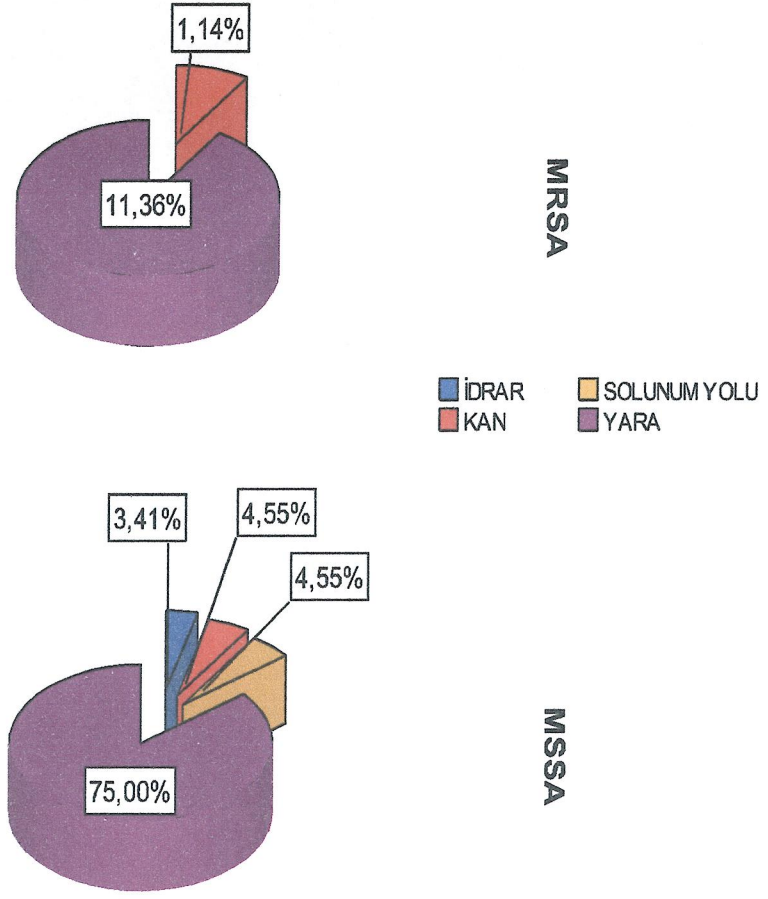
Şekil 3.4 Şematik olarak PFGE (166)

4. BULGULAR

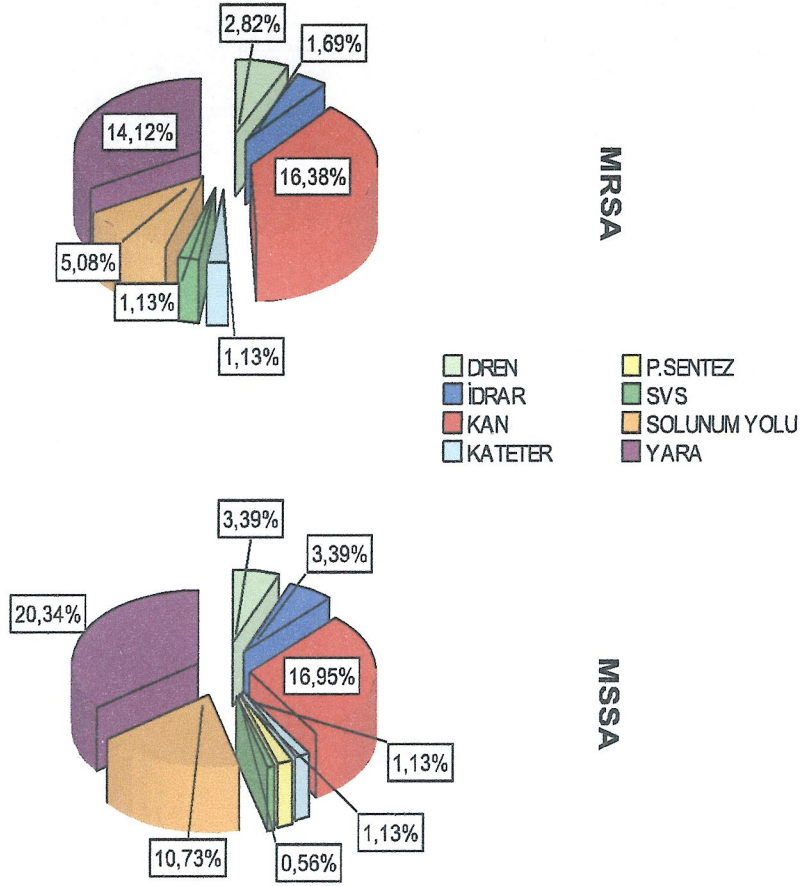
Çalışmamızda *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) kriterleri (145) dikkate alınarak; 88 toplum kökenli, 177 hastane kökenli toplam 265 *S. aureus* suşu izole edildi. Disk difüzyon yöntemi ve *mecA* gen varlığı araştırılarak 86 (%33) *S. aureus* suşu MRSA olarak tanımlandı. Sefoksitin ve oksasilin direncine rastlanmayan 179 (%68) suş ise CLSI'nin belirlediği kriterler doğrultusunda MSSA olarak kabul edildi. Toplum kökenli *S. aureus* suşlarından; 11'i(%12) MRSA, 77'si(%88) MSSA, hastane kökenli *S.aureus* suşlarından ise 75'i(%42) MRSA, 102'ü(%58) MSSA idi.

S. aureus suşlarının en fazla izole edildiği klinik örnek toplum kökenli suşlarda %86, hastane kökenli suşlarda %34 ile yara ve abse kültürüdür. Bunu hastane kökenli suşlarda %33, toplum kökenli suşlarda %6 ile kan kültür örnekleri takip etmektedir. Yara ve abse kültürlerinden izole edilen toplum kökenli 76 *S. aureus* suşunun 66'sı MSSA ve 10'u MRSA, hastane kökenli 61 suşun ise 36'sı MSSA, 25'i MRSA idi.

Çalışmamıza alınan toplum ve hastane kökenli *S. aureus* suşlarının izole edildikleri klinik örneklere göre MRSA ve MSSA dağılımı Şekil 4. 1 ve 4. 2'de sunulmaktadır.



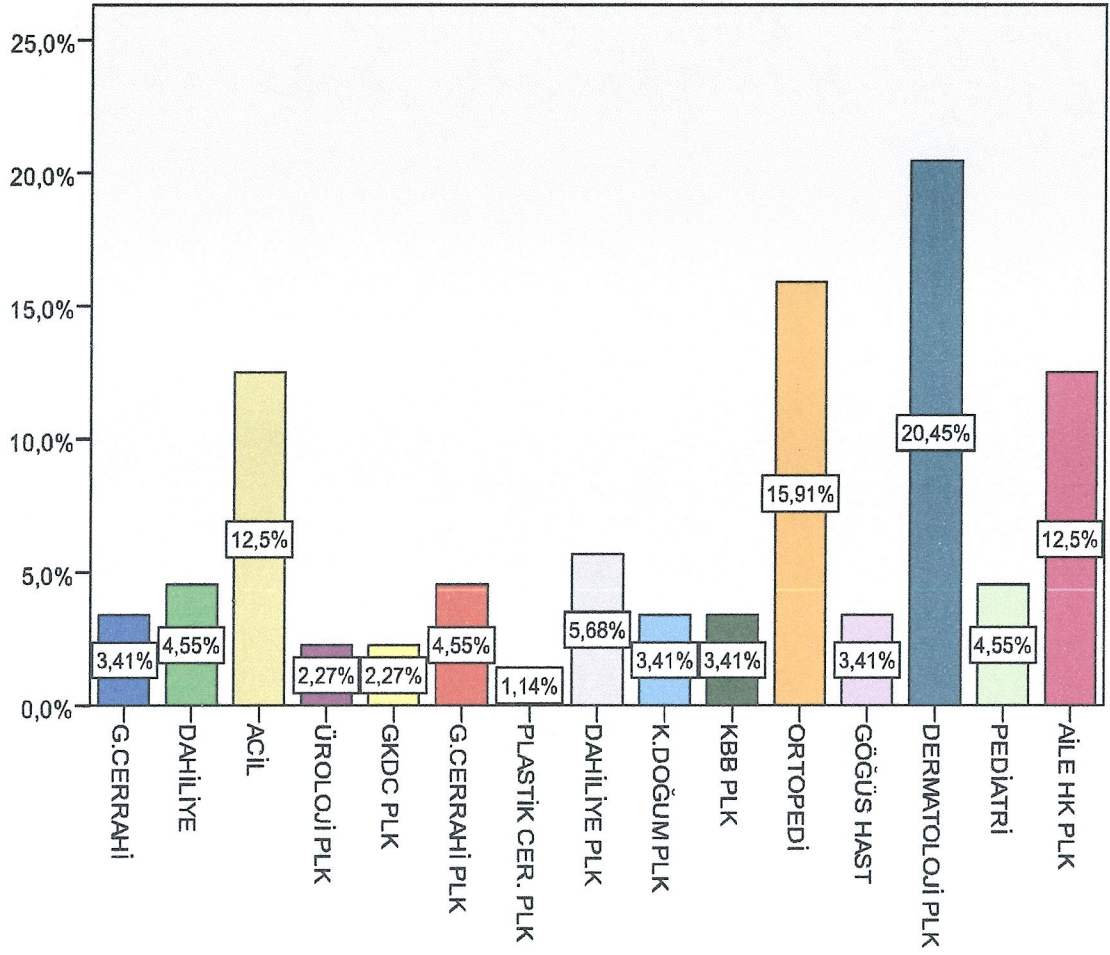
Şekil 4.1 Çalışmaya alınan Toplum Kökenli *S.aureus* suşlarının klinik örneklerle göre MRSA ve MSSA dağılımı



Şekil 4.2 Çalışmaya alınan Hastane Kökenli *S.aureus* suşlarının klinik örneklere göre MRSA ve MSSA dağılımı

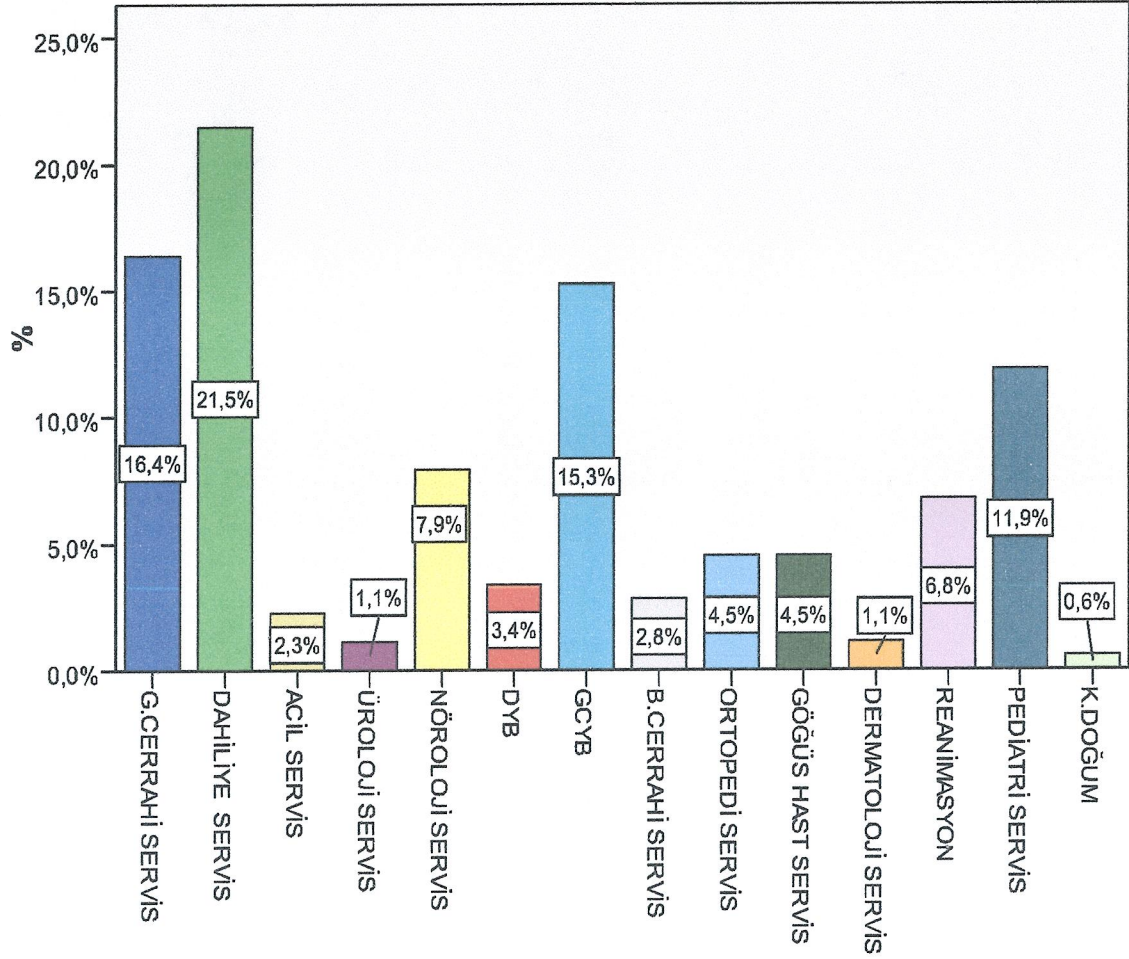
*SVS: Steril Vücut Sıvıları, *P.SENTEZ: Parasentez

Çalışmamıza alınan toplum kökenli *S. aureus* suşlarının çoğunluğu, %20 ile dermatoloji polikliniği, %16 ile ortopedi servisi ve %13 ile de aile hekimliği polikliniğinden gönderilen klinik örneklerden izole edildi. Hastane kökenli *S. aureus* suşları ise %22 oranı ile en sık dahiliye servislerinden, %16 ile genel cerrahi servisten ve %15 ile de genel cerrahi yoğun bakımdan izole edildi. Toplum kökenli *S. aureus* suşlarının izole edildikleri servis ve polikliniklere göre dağılım grafiği Şekil 4. 3'te, hastane kökenli *S. aureus* suşlarının dağılım grafiği 4. 4'te sunulmaktadır.



Şekil 4.3 Toplum Kökenli *S. aureus* suşlarının izole edildikleri servis ve polikliniklere dağılımı

*G.CERRAHI: Genel Cerrahi, GKDC PLK: Göğüs Kalp Damar Cerrahi Poliklinik, KBB PLK: Kulak Burun Boğaz Poliklinik, AİLE HK PLK: Aile Hekimliği Poliklinik.

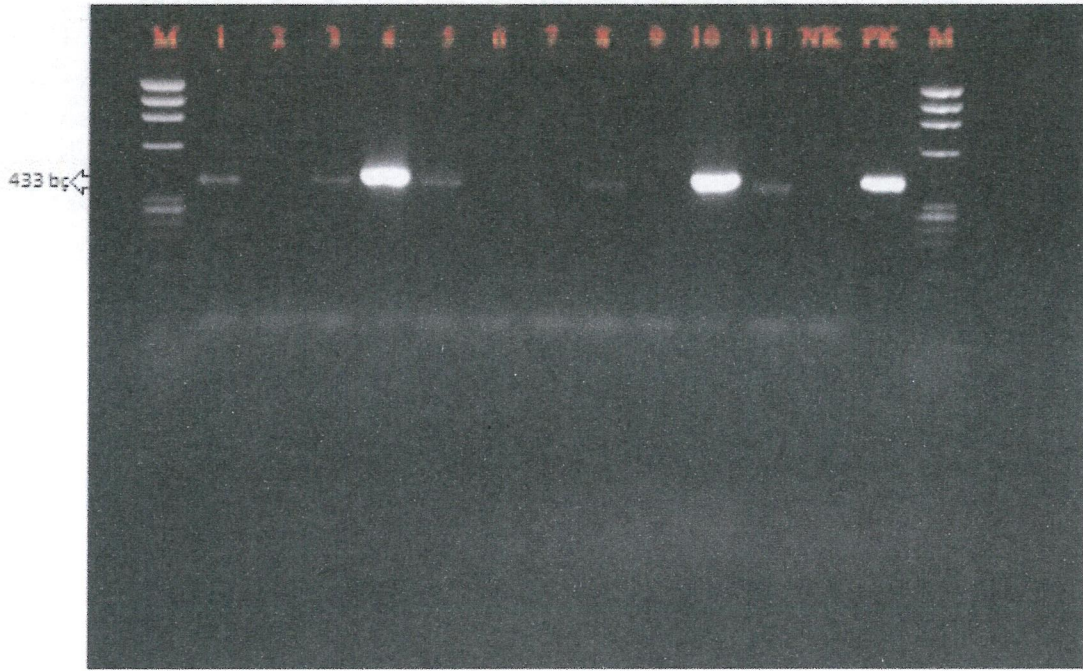


Şekil 4.4 Hastane Kökenli *S. aureus* suşlarının izole edildikleri kliniklere dağılımı

*DYB: Dahiliye Yoğu Bakım, GCYB: Genel Cerrahi Yoğun Bakım

***Panton-Valentine lökosidin* Pozitif *S. aureus* Suşlarının Değerlendirilmesi**

Çalışmamızda *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizi ve agaroz jel elektroforezi sonucunda, izole edilen toplum kökenli 88 *S. aureus* suşunun 13'ünde (%15), hastane kökenli 177 *S. aureus* suşunun ise 6'sında (%3) *Panton-Valentine lökosidin* 433 bp'lik gen bölgeleri pozitif saptandı. Örnek olarak PVL gen bölgeleri pozitif ve negatif bulunan izolatlara ait PZR jel görüntüleri Şekil 4. 5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 PVL gen bölgeleri pozitif ve negatif bulunan izolatlara ait PZR jel görüntüleri: Jel elektroforezde *lukS/F-PV* gen bölgesi; 1,3-5,8,10,11. örnekler; *lukS/F-PV* pozitif, 2,6,7,9. örnek; *lukS/F-PV* negatif, NK; negatif kontrol, PK; *lukS/F-PV* pozitif kontrol (433 bç), M; 1 kb DNA Ladder (Promega)

Panton-Valentine lökositidin pozitif saptanan toplum kökenli *S. aureus* suşlarının tamamı MSSA idi. Hastane kökenli PVL pozitif saptanan suşlardan ise 5'i MSSA, 1'i MRSA idi. Hastane Kökenli MSSA izolatları arasında PVL pozitiflik oranı %5 (5/102), ve MRSA izolatları arasında ise %1 (1/75) bulundu.

Panton-Valentine lökositidin pozitif saptanan toplum kökenli *S. aureus* suşların 12'si(%92) yara ve abse kültürü, 1'i(%8) solunum yolu kültüründen izole edildi. Hastane kökenli PVL pozitif saptanan suşlardan ise 4'ü(%67) yara ve abse, 2'si(%33) kan kültüründen izole edildi. Çalışmamızda hastane kökenli olan ve PVL pozitif saptanan tek MRSA suşu; pediatri servisinden gönderilen kan kültüründen izole edildi.

Toplum kökenli PVL pozitif saptanan *S. aureus* suşlarının %15'er oran ile en sık gönderildiği klinikler; dermatoloji, dahiliye ve genel cerrahi polikliniği ile ortopedi servisidir. Toplum kökenli PVL pozitif bulunan *S. aureus* suşlarının izole edildikleri servis ve polikliniklere göre klinik örnek dağılımı Tablo 4. 1'de, hastane kökenli *S. aureus* suşlarının izole edildikleri servislere göre ayrıntılı MRSA, MSSA ve klinik örnek dağılımı Tablo 4. 2'de sunulmaktadır.

Tablo 4.1 PVL pozitif bulunan toplum kökenli *S. aureus* suşlarının servis ve örnek tipine göre dağılımı

	T.ASPİRAT	YARA
Aile Hk Plk*	-	1
Dahiliye Plk	-	2
Dahiliye Servis	-	1
Dermatoloji Plk	-	2
G.Cerrahi Plk	-	2
GKDC Plk*	-	1
Göğüs Hast. Servis	1	-
Ortopedi Servis	-	2
Pediyatri Servis	-	1
Toplam	1	12

*GKDC: Göğüs Kalp Damar Cerrahi, AİLE HK PLK: Aile Hekimliği Poliklinik.

Tablo 4.2 PVL pozitif bulunan hastane kökenli *S. aureus* suşlarının servis, örnek tipi ve etkene göre ayrıntılı dağılımı

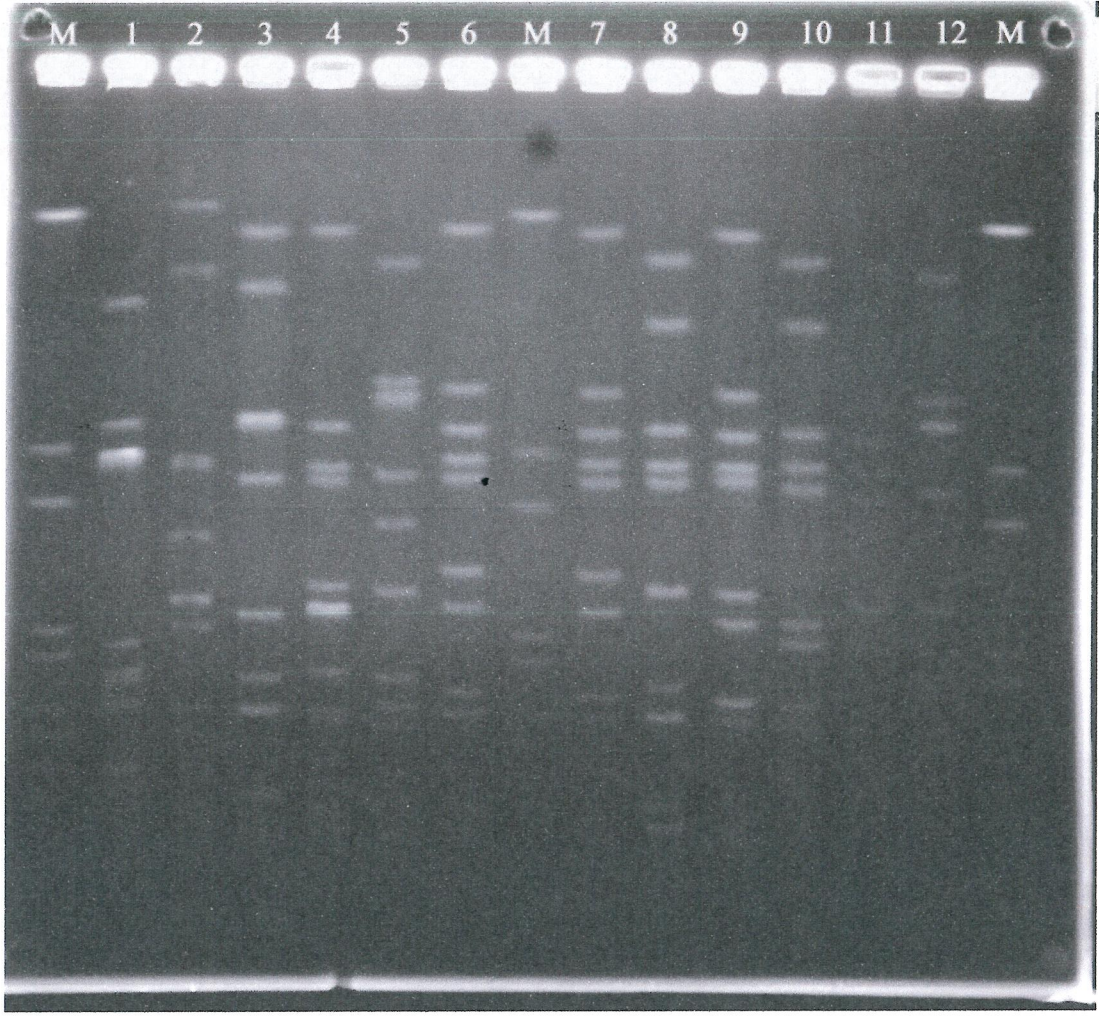
		MRSA	MSSA	TOPLAM
NÖROLOJİ SERVİS	KAN	-	1	2
	YARA	-	1	
REANİMASYON	YARA	-	1	1
GÇYB*	YARA	-	2	2
PEDİATRİ SERVİS	KAN	1	-	1

*GÇYB: Genel Cerrahi Yoğun Bakım

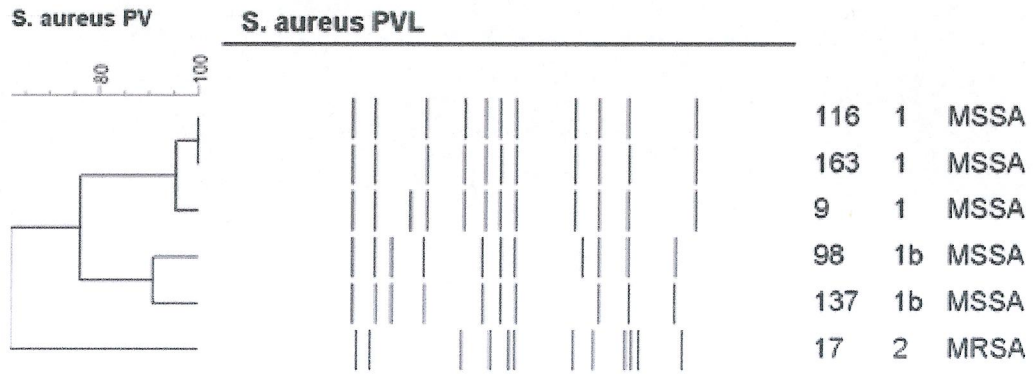
PVL gen bölgeleri pozitif bulunan *S. aureus* suşlarına uygulanan PFGE'nin Sonuçları

Panton-Valentine lükosidin gen bölgeleri PZR ve agaroz jel elektroforezi ile pozitif saptanan 13 toplum kökenli, 6 hastane kökenli toplam 19 *S. aureus* suşu arasındaki klonal ilişki altın standart olarak kabul edilen pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile araştırıldı. İzolatlar arasındaki klonal ilişkisi Tenover ve arkadaşlarının (157) önerdiği kriterler doğrultusunda değerlendirildi. Bu bağlamda; hastane kökenli 5 MSSA suşu klonal olarak ilişkili bulundu. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri Tenover kriterlerine göre değerlendirildiğinde üçü ayırt edilemez, ikisi ise uzak ilişkili olarak bulundu. Hastane kökenli MRSA suşu ile diğer *S. aureus* suşları arasında ise klonal olarak ilişki belirlenmedi.

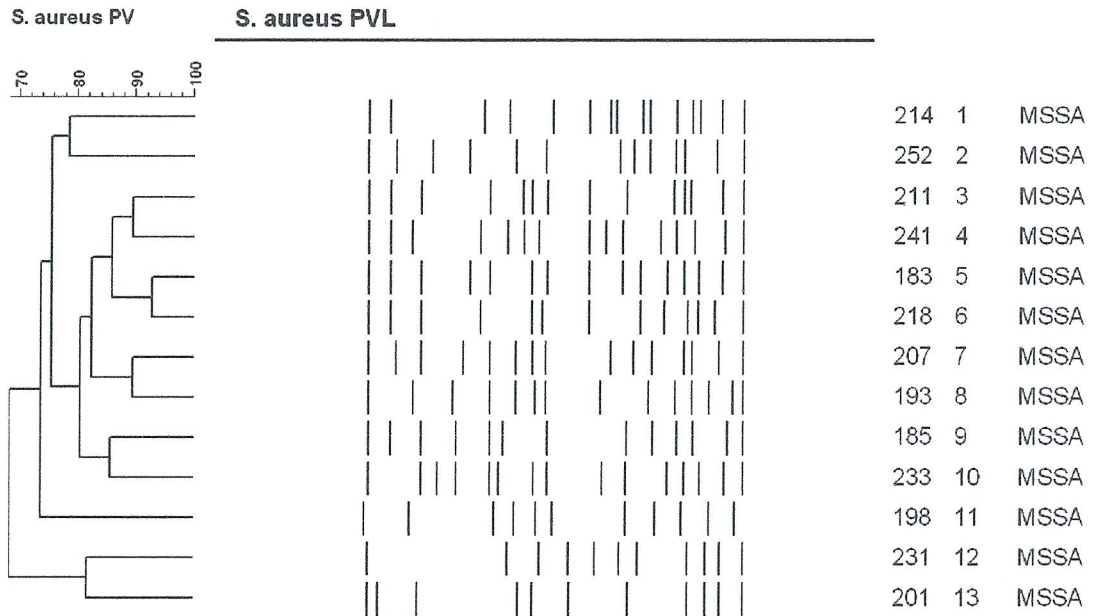
Toplum kökenli PVL pozitif saptanan 13 MSSA suşları incelendiğinde; suşlar arasında klonal olarak ilişki belirlenmedi. İzolatların her birinin ayrı bir genetik tür olduğu saptandı. PVL pozitifliği saptanan izolatların PFGE ile elde edilen örnek görüntüleri Şekil 4. 6'da sunulmaktadır. PVL gen bölgeleri pozitif bulunan HK-*S. aureus* suşlarının PFGE dendogram görüntüleri Şekil 4. 7'de, TK-*S. aureus* suşlarının ise Şekil 4. 8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.6 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan *S. aureus* suşlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüleri: PFGE'de; 6,7 ve 9. suşların makrorestriksiyon paternleri birbirleri ile ayırt edilemez. 8 ve 10. suşlar uzak ilişkili



Şekil 4.7 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan HK-*S. aureus* suşlarının PFGE dendrogram görüntüleri



Şekil 4.8 PVL gen bölgeleri pozitif bulunan TK-*S. aureus* suşlarının PFGE dendrogram görüntüleri

5. TARTIŞMA

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık etkeni olan mikroorganizmalardan biridir. Toksin ve enzimleri ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından, yaşamı tehdit eden pnömoni ve toksik şok sendromu gibi çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir (52,167). İlk kez 1880 yılında keşfedilen *S. aureus*'un; o günlerde, küçük deri enfeksiyonları ve ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarına neden olan Gram-pozitif, patojen bir bakteri olduğu gösterilmiştir. Penisilin 1940 yılında tıbbi olarak kullanıma girmesinden önce; *S. aureus* enfeksiyonu sonrası mortalite oranı yaklaşık %80 olarak bildirilmiştir (168). 1942 yılında penisiline dirençli ilk *S. aureus* izolatu; önce hastaneden, kısa bir süre sonra da toplumdan izole edilmiştir. 1960 yılından bugüne *S. aureus* suşlarının yaklaşık %80'i penisiline karşı dirençli hale gelmiştir. Metisilin klinik kullanıma girmesinden 2 yıl sonra, İngiltere'de penisiline dirençli *S. aureus* suşunun *mecA* genini kazanması ile ilk metisiline dirençli suşlar ortaya çıkmıştır (59,169–171). Son 60 yıl boyunca, hastane kökenli metisiline dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) klonları tüm dünyada yaygınlaşmıştır (169–171).

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. MRSA suşlarının önemi sadece beta-laktam antibiyotiklere değil, diğer birçok antimikrobiyale de dirençli olabilmeleridir (59,169). Bu nedenle MRSA suşlarının tespit edilmesi önem taşımaktadır. Metisilin direncinin tespitinde genellikle uygulaması kolay, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, maliyet etkin olan disk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Ancak *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında altın standart, *mecA* geninin PZR yöntemiyle

gösterilmesidir (172). Çalışmamızda metisilin direnci; Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin ve oksasilin diskleri kullanılarak belirlendi. MRSA olarak saptanan suşlarda ise doğrulama amacı ile PZR yöntemi ile *mecA* gen varlığı araştırıldı. Çalışmamızda toplum kökenli suşların %12'si, hastane kökenli suşların ise %42'si MRSA olarak saptandı.

Bugün MRSA izolatları tüm dünyada hastane enfeksiyonlarının çoğunluğunun nedenidir. Son on yıl içinde MRSA değişen epidemiyolojisi ile ciddi toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan patojen haline gelmiştir (32,135,167,173,174). İnfluenza'nın yaygın olarak görüldüğü mevsimde, ABD'de yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada, *S. aureus*'un neden olduğu pnömonilerde; 1986 ve 2005 yılları arasında %12 olan MRSA oranı, 2006–2007 yıllarında %79 olarak bulunmuştur (175). SENTRY Antimikrobiyal sürveyans programı çerçevesinde dünya çapında hastanelerde yapılan araştırmada; ülkemiz için MRSA prevalansı %37.5 olarak bildirilirken; Avustralya'da %23, Japonya'da %67, Latin Amerika'da %35, Güney Amerika'da %40, ABD'de %32, Avrupa'da ise %26 olarak bildirilmiştir. Ancak, Avrupa ülkeleri arasında MRSA prevalansı değişkendir (176,177). Tiemersma ve arkadaşları (178) güney ülkelerinde MRSA prevalansının %45 gibi yüksek iken, kuzey ülkelerinde MRSA prevalansının yaklaşık %1 olduğunu göstermiştir (178). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda MRSA oranını; Kurutepe ve arkadaşları %32.4, Arıdoğan ve arkadaşları %41, Aydın ve arkadaşları %10.9, Altun ve arkadaşları %46, Ekşi ve arkadaşları ise %61.2 olarak bildirmişlerdir (179–183). Hastanemizde 1997, 2005 ve 2009 yıllarında yapılan çalışmalarda MRSA oranı sırasıyla %35.4, %32 ve %36.4 olarak bulunmuştur (184–186). Çalışmaya aldığımız toplum ve hastane kökenli 265 *S. aureus* suşunda; MRSA oranı %32 dir.

MRSA suşlarının tüm dünyada korkutucu yayılımına ek olarak, 1990'lı yıllardan bu yana, *Panton-Valentine lökositine* toksin varlığı ile karakterize virülen toplum kökenli *S. aureus* (TK-*S. aureus*) klonları gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar; bu klonların ilk olarak toplumda, sonrasında hastane ortamında hızla yayılmakta olduğunu göstermektedir. Şu anda, TK-*S. aureus* ve HK-*S. aureus* arasında ayırım yapmanın gerekliliği tartışılır duruma gelmiştir (32,167,174).

Bakteriyemi, pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit gibi çeşitli enfeksiyonlar için önemli bir patojen olan *S. aureus*'un hastalık oluşturma kapasitesi (patojenitesi), konak ve organizma arasındaki dengeye bağlıdır. Özellikle yumuşak doku ve cilt enfeksiyonları ile toplumdaki kazanılmış pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşlarında tespit edilen PVL; nekroz veya apoptozis ile polimorfonükleer hücrelerde harabiyete neden olduğundan, *S. aureus*'un virülansında büyük önem taşımaktadır (115). Nötrofiller ve polimorfonükleer lökositler (PMNL) patojen mikroorganizmalara karşı konak savunmasında en önemli hücrelerdir. Primer nötrofil defekti olan hastalarda bakteriyel enfeksiyonlara karşı belirgin artış, konak savunmasında PMNL'lerin önemini göstermektedir. Örneğin, ağır konjenital nötropeni, lökosit adezyon eksikliği, kronik granülomatöz hastalık ve nötrofil spesifik granül eksikliği olan kişiler, tekrarlayan *S. aureus* enfeksiyonlarının gelişimi için yüksek risk altında bulunmaktadır (187). Nötrofillerin bakteriyel enfeksiyonlara karşı hücresel savunmada ana bileşen olduğu düşünüldüğünde, konak nötrofillerinin destrüksiyonu TK-*S. aureus* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir anahtar rol oynamaktadır. Voyich ve arkadaşları(188) ile Genestier ve arkadaşları(115) tarafından yapılan son çalışmalar, bu fikre güçlü destek vermektedir. Genestier ve arkadaşları *S. aureus*'un insanlarda neden olduğu enfeksiyonlar sırasında PVL'nin nötrofil destrüksiyonunun birincil nedeni olduğunu ve nekrotizan pnömoni gibi ciddi enfeksiyonları tetiklediğini öne sürmektedirler. Özellikle, farklı toksin konsantrasyonlarında in vitro rekombinant PVL ile yapılan çalışmalarda; nötrofil apoptozisi veya nekrozuna yol açan, konsantrasyon bağımlı bir etki gösterilmiştir. Bu etkide tahminen (*B-cell lymphoma-2 associated X protein*) Bax-bağımsız apoptoz, mitokondri zarlarında PVL aracılı por oluşumuna yol açan yeni bir yol ile meydana gelmektedir. PVL sublitik konsantrasyonlarda 6 saat içinde insan nötrofillerinde apoptozu tetiklemekte, yüksek toksin konsantrasyonlarında ise 1 saat içinde hücre lizisine neden olmaktadır (14,115,189).

Tedavisi zor çeşitli enfeksiyonlara neden olan *S. aureus* suşları; kolay yayılmaları, hastane personeli ve hastalarda rahatlıkla kolonize olmalarından dolayı kontrol edilmesi güçleşmektedir. *Panton-Valentine lökosidin* özellikle toplum kökenli *S. aureus* suşlarında sık görülmekte, ancak bu sitotoksinin hastane kökenli *S.*

aureus suşlarında da hızla yayılmaya başladığı bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (7,190,191).

Center for Diseases Control and Prevention; HK-*S. aureus* ve TK-*S. aureus* ayrımını tanımlarken; hastaneye yatıştan 48 saat içerisinde pozitif bir *S. aureus* kültürü olmasını TK-*S. aureus* lehinde yorumlamaktadır. Ancak, toplum ve hastane kökenli *S. aureus* suşların benzerlikleri ve değişen epidemiyolojisi nedeni ile TK-*S. aureus*'u tanımlarken ilave mikrobiyolojik özelliklerin araştırılması gerektirmektedir (195). Salgado ve arkadaşları(169) meta-analiz çalışmalarında; *S. aureus* kolonizasyonunun yıllar sürdüğü ve HK ve/veya TK-*S. aureus* suşlarının hastalık tablosu oluşumuna kadar klinik olarak fark edilmediğini belirtmişlerdir. TK-*S. aureus* ifadesinin; bakterinin toplumdan ediniminden ziyade kolonizasyon veya enfeksiyonun toplumda saptanması anlamına geldiğini ileri sürmektedirler (169). Çalışmamızda izolatların toplum veya hastane kökenli olması CDC kriterleri dikkate alınarak değerlendirildi. Bu bağlamda; izole edilen *S. aureus* suşlarının; 88'i toplum kökenli, 177'si hastane kökenli olarak belirlendi.

Panton-Valentine lükosidin üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu stafilokokal kaset kromozom mec (SCCmec) tip IV ve V ile bağlantılı olarak, MRSA üzerindedir (7,203). Ancak epidemiyolojik çalışmalarda, PVL'in metisine duyarlı *S. aureus* suşlarında yayıldığına dair bildirimler yapılmaktadır (204). Birçok çalışmada MSSA nazal kolonizasyonun MRSA'dan daha yaygın olduğunu bildirmektedir (205). 1950'lerde *lukSF-PV* genleri bulduran ST80 MSSA suşları deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca son raporlarda PVL pozitif MSSA suşlarında deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoniye neden olduğu bildirilmektedir (206,207). Çalışmamızda izole ettiğimiz PVL pozitif TK-*S. aureus* suşların tamamı, HK *S. aureus* suşlarının ise %83'ü MSSA dır.

S.aureus deri, burun ve nasofarinks normal florasında yer almaktadır (13,39,37). ABD'de 2001–2002 yılları arasında nazal *S. aureus* kolonizasyonlarında PVL varlığını belirlemek amacı ile 10 000 sağlıklı gönüllüde yapılan bir çalışmada; MSSA suşlarının %1'inin, MRSA suşlarının %8'nin PVL eksprese ettiği bildirilmiştir (208). Muttaiyah ve arkadaşları(209) yaptıkları çalışmada nazal MSSA

taşıyıcılarında PVL pozitiflik oranını %31, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu ile pnömonilerden izole ettikleri MSSA suşlarında ise % 37 olarak bildirmişlerdir. Blaine ve arkadaşları(210) yoğun bakım ünitelerinde yaptıkları çalışmada; nazal MRSA kolonizasyonu olan hastaların %8.3'de PVL varlığı tespit etmişler ve PVL pozitif hastaların %38.5'de bakteriyemi, %23.1 de ise mortalite bildirmişlerdir. Chiu ve arkadaşları(211) enfeksiyon etkeni olarak ve nazal kolonizasyonlardan izole ettikleri MSSA suşlarını karşılaştırmak amacı ile yaptıkları çalışmada; enfeksiyon etkeni olarak izole edilen MSSA suşlarında %20, nazal kolonizasyonlarda ise %1 oranında PVL pozitifliği saptamışlardır. Ayrıca, PVL pozitif MSSA enfeksiyonları olan hastalarda ateşin anlamlı derecede daha uzun sürdüğünü ve C-reaktif protein düzeylerinin PVL-negatif MSSA enfeksiyonu olan hastalara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. PVL geninin prevalansı klinik izolatlarda, kolonizasyon izolatlarına oranla daha yüksek bulunduğunu; bu bulgunun ise PVL geninin *S. aureus* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığını gösterdiği, şeklinde yorumlamaktadırlar. Asemptomatik burun taşıyıcılığı TK-*S. aureus* tanımlaması için kullanılamamasının nedeni; *S. aureus* suşlarının ne kadar süredir burunda bulunduğunu anlamanın imkânsız olmasıdır. Hastaların nazal sürüntüsünde *S. aureus* belirlenmesinden çok önce kolonize olmuş olabilir. Bu nedenle; bu suşlar toplum veya hastane kökenli olabilir. Ne olursa olsun, yatan hastalarda PVL pozitif ve toplum kökenli olduğu düşünülen *S. aureus* suşlarını görmek endişe vericidir.

Dünyada ve ülkemizde MSSA ve MRSA izolatlarında PVL gen bölgesinin araştırıldığı farklı çalışmalarda değişik oranlarda pozitiflik (%0,44-%85) bildirilmektedir (222,223). Bazı çalışmalarda MRSA suşlarındaki PVL pozitiflik oranı MSSA suşlarındaki PVL pozitiflik oranından daha yüksek iken, bazı çalışmalarda da tersi bir durum söz konusudur (93,191,224). İki bin onbir yılında Kaltsas ve arkadaşları(225) yaptıkları çalışmada; cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole ettikleri MSSA suşlarının %36'sının, MRSA suşlarının ise %77'sinin PVL gen bölgelerini taşıdığını bildirmiş ve PVL pozitif *S. aureus* suşları ile enfekte olan hastaların PVL negatif *S. aureus* ile enfekte olanlara göre daha genç yaşta olduklarını belirtmişlerdir. Lina ve arkadaşları(99) çeşitli klinik örnekten izole ettikleri *S. aureus* suşlarının %37'sinde ve TK-MRSA suşlarının ise %85'inde PVL geni tespit etmişler; PVL pozitif olarak saptadıkları *S. aureus* suşlarının en sık

fronküllerden izole edildiğini bildirmişlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada; cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu ile kliniğe başvuran hastalardan izole edilen MRSA'da %50 oranında PVL pozitifliği bildirilmiştir (135).

Yunanistan'da 3 yıllık sürede yapılan bir çalışmada, toplum kökenli MRSA suşlarında %72, hastane kökenli MRSA suşlarında %23, poliklinik hastalarından izole edilen MSSA suşlarında %20 ve yatan hastalardan izole edilen MSSA suşlarında ise %5 oranında PVL pozitifliği saptandığı bildirilmiştir (191). Diep ve arkadaşlarının(124) yaptıkları çalışmada, hastane servis ve polikliniklerinden izole edilen MRSA izolatların %37'sinde, MSSA izolatların ise %6.7'sinde PVL pozitifliği saptanmışlardır. Aynı çalışmada mahkumlardan izole edilen MRSA izolatlarında prevalansın %70'e ulaştığı ve PVL pozitif izolatların esas olarak iki klonal gruba ait olduğu gösterilmiştir. Chini ve arkadaşları(191); TK-MRSA izolatlarında %72, HK-MRSA izolatlarında ise %23 oranında PVL gen pozitifliği saptamışlar ve PVL pozitif MRSA suşlarının hızla hastane ortamına yayıldığını belirtmişlerdir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada 2000 yılında toplanan MRSA izolatlarının %5'inde, 2002 yılında toplanan MRSA izolatlarının ise %15'inde PVL bulunmuştur (226). Takano ve arkadaşları(227) 42 TK-MRSA suşunun 25'inde PVL pozitifliği belirlemişler, PVL pozitif suşların 20'si SCCmec type V_T olarak bildirmişlerdir. Kanada'da yapılan bir çalışmada da klinik MRSA izolatlarının %50'sinde PVL saptanmıştır (101). Cupane ve arkadaşları(228) yatan çocuk hastalarda yaptıkları çalışmada; *S. aureus* izolatlarının %75 oranında PVL geni taşıdıklarını ve PVL pozitif invaziv enfeksiyonu bulunan hastaların PVL negatif invaziv enfeksiyonu olan hastalara göre hastanede önemli ölçüde daha uzun kaldığı bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Akoğlu ve arkadaşları(241) HK-MRSA izolatlarının epidemiyolojik ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yaptıkları çalışmada; izolatların 68(%62)'inde SCCmec tip III, 38(%35)'inde SCCmec varyant IIIB ve 3(%3)'ünde SCCmec tip IV tespit etmişler, 14(%13) suşta PVL gen bölgesi saptamışlardır. PVL gen bölgesi içeren suşların 10'unda SCCmec tip III, 4'ünde SCCmec varyant tip IIIB saptanmışlar, SCCmec IV taşıyan suşların hiçbirinde PVL gen bölgesi bildirmemişlerdir. Çalışmada TK-MRSA suşlarının

önemli bir virülans faktörü olan PVL, HK-MRSA izolatlarında da yüksek oranda saptanmıştır. Bu durum MRSA izolatlarının değişen epidemiyolojisinin takibinin önemini vurgulamaktadır. Özkul ve arkadaşları(242) 2005 ve 2006 yılına yaptıkları çalışmada; MSSA suşlarında 2005 yılında %5 olan PVL pozitifliğinin 2006 yılında %10'a çıktığını belirlemişlerdir. Kırdar ve arkadaşları(244) HK çeşitli örneklerden izole ettikleri 37 MRSA suşundan hiçbirisinde PVL geni tespit edememişlerdir. Cirit ve arkadaşları(245) 130 MRSA, 20 MSSA izolatında yaptıkları çalışmada; 2 MRSA, 1 MSSA suşunda PVL pozitifliği bulmuşlardır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesinde 170 HK-MRSA, 20 TK-MRSA suşunda yapılan çalışmada; HK suşların %3'ünde, TK suşların ise %5'inde PVL gen bölgesi varlığı bildirilmiş ve PVL gen bölgesinin tespitinin PVL pozitif *S. aureus* suşlarının yayılımını önlemek açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (246). Karahan ve arkadaşları(248) 2008 yılında yaptıkları çalışmada ise; MRSA suşlarının % 3'ünde ve MSSA suşlarının %9'unda PVL gen bölgesi saptamışlar, PVL pozitif bulunan suşların 7'si yara, 4'ü idrar ve 1'i de eklem sıvısından soyutlanmıştır. Ayrıca PVL toksin geni içeren suşlardan 11'inin TK-MRSA, 1'inin HK-MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde PVL gen bölgesinin araştırıldığı diğer çalışmalarda; Öksüz ve arkadaşları(249) MRSA izolatlarında %41, Kılıç ve arkadaşları(250) %1,3 PVL toksin gen bölgeleri saptamışlar ve Öksüz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada cilt, yumuşak doku ve solunum yolu örneklerinde PVL varlığının araştırılmasının ciddi enfeksiyonların önleminde önemli olacağını vurgulamışlardır. Baran ve arkadaşları(243) 2'si TK-MRSA, 28'i HK-MRSA suşunda yaptıkları çalışmada; HK-MRSA izolatlarının %86'sında SCCmec tip III, %4'ünde SCCmec tip IV, TK-MRSA izolatlarını SCCmec tip IV olarak bildirmişlerdir. Pantone-Valentine lökositin gen bölgelerinin yalnızca TK-MRSA olarak tanımlanan iki izolatta pozitif olduğunu belirlemişler ve bunların PFGE analizinde; klonal olarak ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Dokuz Eylül Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, 2005-2007 yılları arasında çeşitli klinik örneklerde üretilen 299 (200 MSSA, 99 MRSA) *S. aureus* suşunda yapılan çalışmada; PVL gen bölgesi içeren suş oranı %4 (10 MSSA, 1 MRSA) olarak saptanmıştır. PVL-pozitif suşların % 18'i kandan (1 MSSA, 1 MRSA), %82'si yara kültürlerinden izole edilmiştir. PVL gen bölgesi içeren 11 suş'un pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile değerlendirilmesi

sonucunda; Dokuz Eylül Üniversitesinden izole edilen suşların dördünün birbiri ile ilişkili bulunduğu bildirilmiştir (247).

Çalışmamızda *Luk-PV1* ve *Luk-PV2* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizi ve agaroz jel elektroforezi sonucunda, toplum kökenli suşların %15'i, hastane kökenli suşların %3'ü *Panton-Valentine lökositidin* pozitif saptandı. Hastane kökenli suşların %34'ü, toplum kökenli suşların %86'sı yara ve abse kültürlerinden izole edildi. PVL pozitif saptanan toplum kökenli izolatların %93'ü, hastane kökenli izolatların ise %67'si yine yara ve abse kültürlerinde belirlendi. PFGE analizinde; hastane kökenli 5 MSSA suşu klonal olarak ilişkili bulundu. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri Tenover kriterlerine göre değerlendirildiğinde üç suş ayırt edilemez, iki suş ise uzak ilişkili olarak belirlendi. Hastane kökenli MRSA suşu ile diğer *S. aureus* suşları arasında ise klonal olarak ilişki saptanmadı. Toplum kökenli PVL pozitif saptanan 13 MSSA suşu incelendiğinde; suşlar arasında klonal olarak ilişki görülmedi.

Son birkaç yıldır TK-*S. aureus* enfeksiyon sayısında dramatik bir artış söz konusudur. Son yapılan araştırmalar; TK- *S. aureus* suşlarının küresel bir epidemi yaparak, hastane salgınlarının nedeni olarak ortaya çıkmaya başladığını bildirmektedir (192–194). TK-*S. aureus* enfeksiyonlarındaki yaygın artış genellikle PVL içeren suşlar ile ilişkilidir. Epidemiyolojik çalışmalar PVL'nin TK-*S. aureus* enfeksiyonlarının sayısındaki bu artışın en önemli virülans faktörlerinden biri olduğunu ortaya koymaktadır (95,98). *S. aureus* suşlarının virülansını önemli ölçüde artıran PVL, *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların klinik seyrini ağırlaştırarak, komplikasyon gelişme riskini artırabilmektedir. PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, hatta salgınlar oluşturması, bu suşların antibiyotiklere karşı direnç genlerini de kazanarak, daha dirençli ve daha virülan *S. aureus* suşlarının ortaya çıkma riskini artırmaktadır (192–194).

Panton-Valentine lökositidin taşıyan *S. aureus* izolatlarının dağılımı coğrafi olarak değişmektedir. Kuzey Amerika'da, TK-*S. aureus* ilişkili enfeksiyonların çoğunluğundan sorumlu olan ST8-USA 300 en baskın klondur (232,135). Avrupa izolatlarında PVL'liği pozitif daha yaygın olarak MSSA izolatlarında

gözlenmektedir. Genel olarak, PVL taşıyan *S. aureus* izolatlarının prevalansı artmaktadır (99,233). İngiltere Sağlık Koruma Ajansı Staphylococcus Referans Birimi (HPA-SRU) 2005 ve 2009 yılları arasında TK-MSSA suşlarının büyük çoğunluğunda, PVL gen bölgesi varlığında istikrarlı bir artış kaydedildiğini, 2005 yılında %38.5 olan TK-MSSA izolatlarında ki PVL pozitifliği, 2010 yılında %61.5'e çıktığını bildirmiştir (229). Avrupa'da PVL pozitif *S. aureus* suşları genelde stafylokokal deri enfeksiyonları ve nekrotizan pnömonilerden izole edilmekte, buna karşılık osteomyelit, sepsis ve endokardit gibi diğer enfeksiyonlardan nadiren sorumlu olduğu bildirilmektedir (8,98,99). Çeşitli çalışmalarda Avrupa'da PVL pozitif *S. aureus* suşları %5'in altında, örneğin Fransa'da %2, İngiltere'de %1.6 olarak tespit edildiği bildirilmektedir. Afrika'da ise PVL pozitif *S. aureus* suşları yaygın olarak görülmektedir; örneğin Cezayir'de %72 ve Batı Afrika'da %30 olarak bildirilmiştir (30,230,231). Bazı yazarlara göre, Avrupa'da ki izolatlarda PVL oranların düşük olması; pvl genlerini taşıyan fajlara, düşük oranda *S. aureus* (%3) suşunun duyarlı olduğu gerçeği ile açıklamaktadırlar (27). PVL üreten *S. aureus* suşlarının Batı Afrika yüksek yaygınlığa sahip olması; bu bölgedeki istikrarsız sosyo-ekonomik koşullar ile bağlantılı olabilir (230). Ramdani ve arkadaşları Cezayir'de ki bir hastanede yaptıkları çalışmada PVL pozitif HK- *S. aureus* oranını % 68 gibi yüksek bir değer bildirilmişlerdir (222). Bazı yazarlara göre, PVL pozitif suşlar ile ilişkili HK-*S. aureus* insidansının yüksek olması hastane salgınları ile açıklanabilir (127,196). Bu durum, bir TK-*S. aureus* klonuna bağlı olarak hastane salgını veya hastane personelinin bu klonu hastane içine taşımış olabileceğini düşündürmektedir. TK-*S. aureus* suşlarının hastane ortamına yayılacağı göz önüne alınacak olursa, HK ve TK-*S. aureus* ayırımını yapmak zorlaşacaktır. Gelecekte PVL geni taşıyan *S. aureus* suşları benzer klinik sendromlara neden olacağından, enfeksiyonun hastane ve/veya toplum kökenli olduğuna bakılmaksızın, hastanın sunumu anlatılırken "PVL sendromu" terimini kullanmak uygun olabilir (173).

Dünyada ve ülkemizde yapılan *S. aureus* suşlarının genetik özelliklerinin incelendiği birçok çalışmada; TK-*S. aureus* izolatlarının PVL genlerini taşıdığı bildirilmiş ve PVL pozitifliği *S. aureus* suşunun toplum kökenli olduğunun önemli bir kanıtı olarak kabul edilmiştir (98,199). Son yıllarda yapılan çalışmalarda TK izolatlarla ilişkili SCCmec tip IV ve PVL içeren *S. aureus* suşları hastanelerden,

hastaneye ait olduğu düşünölen SCCmec yapısı içeren *S. aureus* suşlarının ise toplumdan izole edildiği bildirilmektedir (200–202). Richter ve arkadaşları (240) 2009 yılında ABD’de 43 merkezde yaptığı *S. aureus* surveyans programında; 4210 örnekten 2247’sini *S. aureus* olarak saptamışlar ve izolatların %51’nin USA 300 (%96.9 PVL pozitif, %99.7 SCCmec tip IV) ve %17’sinin USA 100 (% 93.4 SCCmec tip II) olduğunu bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda; PVL’nin toplum kökenli enfeksiyonlara neden olan pulsed-field tip USA 300 ve USA 400 *S. aureus* suşlarının büyük kısmında bulunduğu, ancak SCCmec tip I, II ve III bulunduran önemli hastane kökenli *S. aureus* suşlarında bulunmadığı ifade edilmektedir (98,196–198). Dufour ve arkadaşları(97) HK-*S. aureus* suşlarında PVL geninin hiçbir zaman bulunmadığını belirtmiş, ancak ölkemizde Akoğlu ve arkadaşları(241) yaptıkları çalışmada; SCCmec tip III ve SCCmec varyant tip IIIB yapısına sahip HK-*S. aureus* suşlarında PVL gen bölgelerinin saptandığını bildirmişlerdir. Wannet ve arkadaşları(224) 2004 yılında Hollanda’da yaptıkları çalışmada; PVL pozitif suşların %80’inin SCCmec tip IV, %10’unun SCCmec tip III ve %10’unun SCCmec tip I taşıdığını bildirmişler ve HK-*S. aureus* suşlarının da PVL geni bulundurabileceğini öne sürmüşler; ayrıca PVL pozitif suşların sadece toplumda değil hastane ortamında da bulunabileceğini belirtmişlerdir. Bu bulgu araştırmacılar arasında farklı yorumlara yol açmıştır. Bazı yazarlar bu durumu, SCCmec tip IV’ün TK-*S. aureus*’a ait bir özellik olmayacağı şeklinde yorumlamışlar, bazı araştırmacılar ise PVL geni taşıyan fajların farklı suşlar arasında kolay yayılımına bağlamışlardır (98). Bu bulgular; TK-*S. aureus* izolatlarının önemli virölans faktörü olan PVL’nin HK-*S. aureus* izolatlarında da bulunabileceği gerçeğini ortaya koymakta ve hastane ortamında yayılımının önlenmesi için epidemiyolojik olarak takibinin önemini göstermektedir.

Toplum kökenli PVL pozitif USA 300 klonu ABD’de giderek yaygınlaşan hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (10,212,213). TK- *S. aureus* suşlarının neden olduğu hastane salgınları en sık olarak HK-*S. aureus* prevalansının düşük olduğu pediatri ve kadın doğum gibi bölümlerden, 2003 yılından bu yana ABD, Almanya, İsrail, İsviçre ve İngiltere’den bildirilmektedir (214–221). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi; Chicago (IL, USA) ve Los Angeles’ta (CA, USA) sağlıklı term doğan bebeklerde USA300 klonuna bağlı hastane enfeksiyon salgınları bildirmiştiir (212). 2003 yılında, Atlanta’da (GA, ABD) hastane kaynaklı beş eklem protez

enfeksiyonuna USA300 klonunun neden olduğu bildirilmiştir (216). Aynı hastanede 2004 yılında 7 ay boyunca tanımlanan 116 *S. aureus* bakteriyemi olgusunun 39'una(%34); bunlardan hastane kaynaklı olduğu belirlenen 49 bakteriyeminin 10'una (%20) USA300 klonunun neden olduğu gösterilmiştir (10). Çoğu salgının tek bir suşun çapraz-enfeksiyon ile yayılımına bağlı olduğu bildirilmektedir. Houston'da (TX, ABD) bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde sepsisli altı hastada TK-*S. aureus* suşlarının tekrarlanan girişinin neden olduğu (217), İsviçrede ise bebekleri etkileyen salgına; fronkülden kaynaklanan bir PVL pozitif *S. aureus* suşunun neden olduğu bildirilmiştir. Farklı PVL pozitif suşlarının neden olduğu Almanya'daki iki salgının sağlık çalışanlarında %17 oranında apse oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (218,219).

Gillet ve arkadaşları 2002 yılında PVL ilişkili nekrotizan pnömoninin klinik özelliklerini, 2007 yılında mortalite ile ilişkili risk faktörlerini tanımlamışlardır. PVL'nin nekrotizan pnömoni patogeneğinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedirler (8,233). Bazı yazarlar PVL'nin patojenik potansiyelini ve PVL genlerinin varlığını, diğer virülans determinantlarının bir göstergesi olarak düşünülmektedir (234,235). *S. aureus*'un çeşitli çalışmalarda; toplum kökenli pnömonilerin %8-68'inden, hastane kökenli pnömonilerin ise %18'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir. PVL negatif *S.aureus* ile enfekte pnömoni hastalarının ölüm oranı %6 iken, PVL pozitif *S. aureus*'lar ile enfekte pnömoni hastalarının ölüm oranı %32 olarak bildirilmiştir (236,237). Bu bağlamda PVL gen bölgelerini ihtiva eden *S. aureus* suşlarına karşı hızlı ve etkin olarak enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında uygulanması sağlanarak hastane ortamında yayılmaları ve bu suşların seleksiyonu önlenmelidir. Özellikle PVL pozitif HK-MRSA'lar acil etkin enfeksiyon kontrol önlemleri gerektiren mikroorganizmalardır (98).

Kreienbuehl ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları araştırmada; influenza benzeri klinik bulgular sonrası PVL pozitif MSSA izole edilen 32 pnömoni hastasını incelediklerinde %41 oranında mortalite tespit etmişler, hastanın kabulünden ölüme kadar geçen ortalama süreyi 20 saat olarak bildirmişlerdir (238). Li ve arkadaşları (239) nekrotizan pnömoni'li fatal bir vakadan PVL ve TSST-1 beraber salgılayan

MSSA suşu izole edildiğini bildirmişlerdir. Bu bulgular hipervirülan *S. aureus* izolatlarının tüm dünyada yayılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Toplum ve hastane kökenli *S. aureus* izolatlarına bağlı gelişen enfeksiyonlarında tedavinin düzenlenmesi ve komplikasyon gelişiminin önlenmesi için PVL pozitif MRSA ve MSSA izolatlarının dikkatlice izlenmesi gerekmektedir. Yapılacak sörveyans çalışmaları, *S. aureus* suşlarının moleküler ve mikrobiyolojik analizi; TK ve HK-*S. aureus* suşlarının epidemiyolojisinin, evriminin ve toksinlerinin insan konak yanıtını nasıl etkilediğinin anlaşılmasında yardımcı olacaktır. Ayrıca oluşabilecek hipervirülan suşların gelişimini önlemek için gerekli tedbirleri almamıza yol gösterebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) kriterleri dikkate alınarak; 88'i toplum kökenli, 177'si ise hastane kökenli *S. aureus* suşu değerlendirildi. Toplum kökenli *S. aureus* suşlarından; %12'si MRSA, %88'i MSSA, hastane kökenli *S.aureus* suşlarından ise %42'si MRSA, %58'i MSSA idi.

2- Lina ve ark. larının (99) tanımladığı 433 bp'lik ürün oluşturan *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri kullanılarak değerlendirilen; toplum kökenli *S. aureus* suşlarından 13'ü(%15), hastane kökenli *S. aureus* suşlarından ise 6'sı (%3) *Panton-Valentine lökositidin* pozitif olarak bulundu. PVL pozitif saptanan toplum kökenli *S. aureus* suşlarının tamamı MSSA, hastane kökenli suşlardan ise 5'i MSSA, 1'i MRSA idi.

3- Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) analizinde; izolatlar arasındaki klonal ilişkisi Tenover ve arkadaşlarının önerdiği kriterler doğrultusunda değerlendirildi (157). Bu bağlamda; hastane kökenli 5 MSSA suşu birbiri ile klonal olarak ilişkili bulundu. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri değerlendirildiğinde üçü birbirleri ile ayırt edilemez, ikisi ise uzak ilişkili olarak belirlendi. Hastane kökenli MRSA suşu ile diğer *S. aureus* suşları arasında ise klonal olarak ilişki saptanmadı. Toplum kökenli PVL pozitif saptanan 13 MSSA suşları arasında ise klonal olarak ilişki belirlenmedi.

Sonuç olarak hastanemizde, toplum kökenli *S. aureus* suşlarında %15, hastane kökenli *S. aureus* suşlarında ise %3 oranında PVL pozitifliği bulunmaktadır.

Bu oranlar, daha önce farklı ülkelerden yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında ortalama bir değer olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda; altın standart olarak kabul edilen pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) analizi sonucunda hastane kökenli PVL pozitif 5 suş arasında klonal olarak ilişki saptanması son derece önemlidir. Bu suşların hastanede salgınlara neden olabileceği, diğer virülans ve direnç genlerini kazanarak, hipervirulan suşlar haline gelebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle toplumda ve hastane ortamında bu suşların yayılımını önleyecek tedbirlerin ve uygulamaların hayata geçirilmesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasının faydalı olacağı kanısındayız.

7. ÖZET

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KLİNİK İZOLATLARINDA *PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN* VARLIĞININ VE KLONAL İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Amaç: *Staphylococcus aureus*, toksin ve enzimleri ile deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, pnömoni ve toksik şok sendromu gibi çeşitli klinik tablolara neden olmaktadır. *S. aureus*, taşıdığı virülans faktörleri ve antibiyotiklere hızlı direnç geliştirme potansiyeli nedeniyle günümüzde büyük bir küresel sorundur. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar sadece toplum için değil aynı zamanda hastanelerde de önemli bir sağlık sorunudur.

S. aureus'un etken olduğu özellikle yumuşak doku ve cilt enfeksiyonları ile toplumdan kazanılmış pnömonilerden izole edilen suşlarda *Panton-Valentine lökositidin* (PVL) tespit edilmektedir. PVL, nekroz veya apoptozis ile polimorfonükleer hücrelerde harabiyete neden olduğundan, *S. aureus*'un virülansında büyük önem taşımaktadır. PVL, *S. aureus*'a bağlı enfeksiyonların klinik seyrini ağırlaştırarak, komplikasyon gelişmesine neden olabilmektedir. PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, hatta salgınlar oluşturması, bu suşların antibiyotiklere karşı direnç genlerini de kazanarak yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Bu çalışmada, hastane ve toplum kökenli *S. aureus* suşlarında PVL varlığının saptanması ve PVL pozitif suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 2008–2012 tarihleri arasında, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda izole edilen; 88 toplum kökenli ve 177 hastane kökenli *S. aureus* suşu çalışmaya alındı. İzolatların toplum veya hastane kökenli ayrımı Center for Diseases Control and Prevention (CDC) önerileri dikkate alınarak yapıldı. Clinical and Laboratory Standarts Institute'nin (CLSI) belirlediği kriterler doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci belirlendi. Metisilin direnci saptanan suşlarda doğrulama testi olarak PZR ile *mecA* gen varlığı araştırıldı.

Toplum ve hastane kökenli *S. aureus* suşlarında; *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri kullanılarak, PVL gen bölgeleri PZR yöntemiyle araştırıldı. PVL pozitif saptanan *S. aureus* suşları arasındaki klonal ilişki pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile araştırıldı.

Bulgular: Çalışılan suşlar içinde, 88 izolat toplum kökenli ve 177 İzolat ise hastane kökenli olarak tanımlandı. Toplum kökenli suşların %12'si metisilin dirençli ve %88'i ise metisilin duyarlı olarak bulundu. Hastane kökenli suşların %42'si metisilin dirençli ve %58'i ise metisilin duyarlı olarak bulundu.

Toplum ve hastane kökenli olarak tanımlanan suşların sırasıyla %86 ve %34'ü yara ve abse örneklerinden izole edildi.

Toplum ve hastane kökenli olarak tanımlanan suşlarda sırasıyla PVL pozitiflik oranı %15 (13 MSSA) ve %3 (5 MSSA, 1 MRSA) olarak saptandı.

PVL-pozitif TK-*S. aureus* suşlarının %92'si yara ve abse kültüründen ve %8'i ise solunum yolu örneklerinden izole edildi. Hastane kökenli PVL-pozitif *S. aureus* suşlarının %67'si yara ve abse örneklerinden ve %33'ü ise kan kültürü örneklerinden izole edildi.

PVL pozitif saptanan hastane kökenli 5 MSSA izolatı PFGE'inde klonal olarak ilişkili bulundu. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri incelendiğinde üçü ayırt edilemez, ikisi uzak ilişkili olarak değerlendirildi. Toplum kökenli PVL pozitif suşlar arasında klonal olarak ilişki belirlenemedi.

Sonuç: Bu çalışmada yaklaşık dört yıllık sürede izole edilen *S. aureus* suşlarında önemli bir virulans faktörü olan *Panton Valentin Lökosidin* sıklığı araştırılmıştır. Bu faktörün sadece toplum kökenli değil hastane kökenli izolatlarda da bulunabileceği gözlenmiş ve hastane ortamında PVL-pozitif türlerin yayılım gösterdiği saptanmıştır. Yapılacak epidemiyolojik çalışmalar, *S. aureus* suşlarının moleküler ve mikrobiyolojik analizi; TK ve HK-*S. aureus* suşlarının insan konak yanıtını nasıl etkilediğinin anlaşılmasında yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, *Panton-Valentine lökosidin*, *mecA*, TK-MRSA, HK-MRSA

8. ABSTRACT

INVESTIGATION OF PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN (PVL) PRESENCE AND THE CLONAL RELATIONSHIP IN THE CLINICAL STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Objective: *Staphylococcus aureus*, can cause various clinical disorders by its toxins and enzymes, such as skin and soft tissue infections, pneumonia and toxic shock syndrome. *S. aureus* is a major global problem due to its virulence factors and the potential to development of resistance to antibiotics. The infections caused by this organism is a major public health problem both in society and in hospitals.

Panton-Valentine leukocidin is determined from *S. aureus* strains which are especially isolated from the soft tissue, skin infections and community-acquired pneumonia. PVL causes destruction on polymorphonuclear cells by necrosis or apoptosis, so that it has great importance in the virulence of this organism. PVL is exacerbating the clinical course of infections because of the fact that *S. aureus* can cause the development of complications. The spread of PVL-positive strains in the hospital environment, and even create epidemics, getting the resistant to antibiotics genes of these strains, increases the risk of mortality and morbidity. In this study, we aimed to investigate the presence of PVL from hospital and community-acquired *S. aureus* strains and to determine the clonal relationship between the PVL-positive strains.

Materials and Methods: In our study, 88 community-acquired and 177 hospital-acquired *S. aureus* strains were studied which were isolated in İnönü University Medical Faculty Hospital at the Department of Medical Microbiology

Laboratory between 2008–2012. Discrimination of *S. aureus* strains whether they are community or hospital-acquired made by the recommendations of Center for Disease Control and Prevention (CDC). The methicillin resistance of the strains were determined by Kirby-Bauer disc diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations and PZR for *mecA* gene was used as confirmatory assay.

PVL gene region was investigated by using PZR method with *Luk-PV1* and *Luk-PV2* primers to the community and hospital-acquired *S. aureus* strains. We investigated the clonal relationship between PVL positive *S. aureus* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: Of the studied strains, 88 were defined as community acquired, and 177 were defined as hospital acquired. A total 12% strains from community-acquired isolates were found as methicillin-resistant, and 88% were methicillin-susceptible. A total 42% strains from hospital-acquired were found as methicillin resistant, and 58% were methicillin-susceptible.

Of the strains defined as community-acquired and hospital-acquired, 86% and 34% were isolated from wound and abscess samples, respectively.

The rate of PVL positivity among community-acquired and hospital-acquired strains were found as 15% and 3% orderly.

Of the PVL-positive CA-*S.aureus* strains, 92% were from wounds and abscesses, and 8% were from respiratory tract culture. Of the HA-*S. aureus* strains, 67% were from wounds and abscesses and 33% were from blood cultures. PVL-positive hospital-acquired five MSSA strains were found clonally-related with each other in PFGE. When the macrorestriction patterns were examined; three of these isolates were indistinguishable, and two were clonally unrelated. Clonal relationship between community-acquired PVL-positive strains were not detected.

Conclusion: In this study, the frequency of a significant virulence factor of *S. aureus* was investigated among the strains which were isolated in the current four

years. We observed that PVL could be found not only in community-acquired strains but also in hospital-acquired strains, and furthermore, nosocomial PVL-positive strains could cause hospital dissemination. Epidemiological studies, molecular and microbiological analysis of *S. aureus* strains will help us to understand how the human host response affects with CA and HA-*S. aureus* strains.

Key Words: *S. aureus*, Pantone-Valentine leukocidine, *mecA*, CA-MRSA, HA-MRSA

7. KAYNAKLAR

- 1) Van den Broek, P.J. *Staphylococcus aureus*, a successful pathogen. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2003;147(22): 1045–8.
- 2) Gravet A, Colin DA, Keller D, et al. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett.* 1998;436(2): 202–8.
- 3) Supersac G, Prévost G, Piemont Y. Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun.* 1993;61(2): 580–7.
- 4) Waldvogel FA: *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone; 2000:2069–92.
- 5) Panton PN, Valentine FC. Staphylococcal toxin. *Lancet.* 1932; 222: 506–8.
- 6) Reichert B, Birrell G, Bignardi G. Severe non-pneumonic necrotising infections in children caused by Panton-Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect.* 2005;50(5):438–42.
- 7) Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation.* 2007; 87(1): 3–9.
- 8) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton–Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002;359(9308):753–9.
- 9) Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype

as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(5): 647–56.

10) Cengiz AT: Staphylococcus. In: Ustaçelebi Ş, Cengiz TA (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi. Ankara. 1999; 339–46

11) Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Staphylococcus, micrococcus, and similar organisms. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. St. Louis, Missouri. Mosby Elsevier. 12th edition. 2007; 254–63.

12) Muray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. *Medical Microbiology*; 4th ed. Philadelphia: Elsevier. 2005;203(12):221–36.

13) Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schereckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related Gram-positive cocci. Winn WC Jr et al (editors). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2006: 623–71.

14) DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009; 119(9):2464–74.

15) Peacock SJ. Staphylococcus. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005: 771–832.

16) Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative staphylococci. Churchill Livingstone, 1995th edition. 177–84.

17) Valles J, Leon C, Alvarez-Lerma F. Nosocomial bacteremia in critically ill patients: a multicenter study evaluating epidemiology. *Clin Infect Dis*. 1997;24(3): 387–95.

18) Rogolsky, M. Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews*. 1979;43(3): 320–60.

19) Van de Velde H. Etude sur le mécanisme de la virulence du staphylocoque pyogène. *La Cellule*. 1894;10: 403–60.

20) Lo WT, Wang CC. Panton-Valentine Leukocidin in the Pathogenesis of Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Pediatrics and Neonatology*. 2011; 52(2): 59–65.

21) Wright J. Staphylococcal leucocidin (Neisser-Wechsberg type) and antileucociddin. *Lancet*. 1936;230: 1002–4.

22) Gladstone GP, van Heyningen WE. Staphylococcal leucocidins. *Br J Exp Pathol*. 1957;38(2): 123–37.

- 23) Woodin AM. Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* 1959;73: 225–37.
- 24) Woodin AM. The effect of staphylococcal leucocidin on the leucocyte. *Biochem J.* 1961;80: 562–72.
- 25) Woodin AM. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochem J.* 1960;75: 158–65.
- 26) Kaneko J, Kimura T, Narita S, et al. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene.* 1998;215(1):57–67.
- 27) Narita S, Kaneko J, Chiba J, et al. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene.* 2001;268(1–2):195–206.
- 28) Rahman A, Izaki K, Kato I, et al. Nucleotide sequence of leukocidin S-component gene (*lukS*) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181(1):138–44.
- 29) Rahman A, Nariya H, Izaki K, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of leukocidin F-component gene (*lukF*) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;184(2):640–6.
- 30) Prévost G, Couppier P, Prévost P, et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol.* 1995;42(4):237–45
- 31) Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç Ve Epidemiyoloji. *Ankem Derg* 2008; 22(Ek 2):276–86.
- 32) Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003;111(9):1265–73.
- 33) Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(1):3–8.
- 34) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* -Pennsylvania, 2002. *MMWR.* 2002;51(40):902.
- 35) Hartstein AL, Sebastian TJ, Strausbaugh LJ. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. MAYHALL CG Ed. *Hospital Epidemiology and Infection Control.* New York, 2004.
- 36) Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog.* 2002;85(1):57–72.

- 37) Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505–20.
- 38) Saravolatz LD, Markowitz N, Pohlod DJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community outbreak. *Ann Intern Med.* 1982; 96(1):11–16.
- 39) Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al. The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 24th ed. New York: McGraw-Hill, 2007.
- 40) Franklin DL. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998; 339(8):520–32.
- 41) Cengiz AT. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji; Ankara: Güneş Kitapevi. 2004:343–50.
- 42) Wilkonson BJ: *Biology, The Staphylococci in Human Disease*, New York, 1997.
- 43) Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfet CM: *Zinsser Microbiology*. Twentieth Edition, Appleton and Lange. 1992:401–16.
- 44) Ryan KJ; Ray CG. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed. McGraw Hill. 2004 <http://content.answers.com/main/content/>
- 45) Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive Sepsis, Mechanisms and Differences from Gram-negative Sepsis, *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(2):397–412.
- 46) Greenberg DP, Bayer AS, Turner D, et al. Antibody responses to Protein A with *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(3):458–62.
- 47) Tünger A, Çavusoğlu C, Korkmaz M. *Mikrobiyoloji, Asya Tıp Yayıncılık.* İzmir. 2003;41–51.
- 48) Balaky, Salah, Tofik. The Effect of Antibiotics on Toxin Gene Expression in PVL-positive *Staphylococcus aureus* Strains. Doctoral thesis, Durham University. 2011. Available at Durham E-Theses Online: <http://etheses.dur.ac.uk/692/>
- 49) Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28(2): 183.

50) Tünger A. Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.2004; 9–22.

51) Aygen B. Stafilocok İnfeksiyonlarında Klinik ve Tanı. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Kongre Kitabı; 331–8. Antalya. 1997.

52) Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):16–34.

53) Gouaux E, Hobaugh M, Song L. Alfa-hemolysin, gama hemolysin, and leukocidin from Staphylococcus aureus: Distant in sequence but similar in structure. Protein Science. 1997; 6(12):2631–5.

54) Noble WC. Staphylococcus Disease. In: Collier L, Balcows A, Susman M (eds). Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections. New York: Oxford University Pres;1998:231.

55) Prévost G, Cribier B, Couppie P, et al. 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;63(10): 4121–9.

56) Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biotechnol Biochem. 2004;68(5):981–1003.

57) Von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, et al. Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(3):157–62.

58) Arda M. Temel Mikrobiyoloji. 2000; 284–314.

59) Chambers HF, DeLeo FR. Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7(9); 629–41.

60) García-Lara J, Masalha M, Foster SJ. Staphylococcus aureus: the search for novel targets. Drug Discov Today. Review. 2005;10(9):643–51.

61) Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004;40(2):101–11.

62) Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilocok İnfeksiyonları. Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul;2002:1507–16.

63) Moreillon P, Que Y, Glauser MP. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition. Volume 2, Elsevier Inc. 2005; 2321–52.

64) Martin RR, Buttram V, Bosch P, et al. Nasal and vaginal Staphylococcus aureus in young women: Quantitative studies. Ann Intern Med. 1982;96(6 Pt 2): 951.

65) Rice LB, Bonomo RA. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, In Lorian V (Eds). Antibiotics in Laboratory Medicine. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 2005;441–508.

66) Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. Curr Infect Dis Rep. 2000; 2(3): 207–14.

67) Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton–Valentine leukocidin genes. Clin Infect Dis. 2005; 40(1): 100–7.

68) Abbott KC, Agodoa LY. Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. Nephron. 2002; 91(2): 203–9.

69) Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet. 2004; 363(9403): 139–49.

70) Akalın HE. İnfektif endokardit. Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabından. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul;2002:721

71) Gonzales C, Rubio M, Romero-Vivac J, et al. Bacteremic pneumonia due to Staphylococcus aureus: a comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms. Clin Infect Dis. 1999;29(5): 1171–7

72) Von Rittershain GR. Die exfoliative Dermatitis jungere Senglinge. Z Kinderheilkd. 1878; 2: 3–23.

73) Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 2002; 359(9320):1819–27.

74) Kain KC, Schulzer M, Chow AW. Clinical spectrum of non- menstrual toxic shock syndrome: Comparison with menstrual TSS by multivariate comparison analyses. Clin Infect Dis. 1993;16(1): 100–6

75) Strausbaugh LJ. Toxic shock syndrome. Postgrad Med. 1993;94(6):107–

76) Chambers HF, Sachdeva M, Kennedy S. Binding Affinity for Penicillin Binding Protein 2a Corralates with in vivo Activity of beta-lactam Antibiotics Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. *J. Antimicrob Chemother.* 1990;162(3): 705–10.

77) Moranan MC, Moreria B, Boyle S, et al. Antimicrobial resistance in staphylococci. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(4): 813–49.

78) Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci, molecular and biochemical basis and implication. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4): 781–91.

79) Carbon C. MRSA and MRSE, is there an answer. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6(3):17–22.

80) Ghuysen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol.* 1994;2(10): 372–80.

81) Chambers HF. Penicillin-binding protein mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis.* 1999;179(2):353–9.

82) Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi. 1999: 91–108.

83) Mederios AA. Cooperative evolution of mechanisms of β -lactam resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6(3):3–5.

84) Hackbarth CJ, Kocagöz T, Kocagöz S, et al. Point mutations in Staphylococcus aureus PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(1): 103–6.

85) Henze UU, Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;49(9):2121–5.

86) Turnidge J, Grayson ML. Optimum treatment of Staphylococcal Infections. 1993;45(3):353–66.

87) Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, et al. Antimicrobial Resistance in Staphylococci. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(4): 813- 49.

88) Ünal S. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri, Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 1996;1: 14–7.

89) Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science.* 2007;315(5815):1130–3.

90) Choorit W, Kaneko J, Muramoto K, et al. Existence of a new protein component with the same function as the LukF component of leukocidin or gamma-hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. *FEBS Lett.* 1995;357(3):260–4.

91) Morinaga N, Kaihou Y, Noda M. Purification, cloning and characterization of variant LukE–LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiol Immunol.* 2003;47(1):81–90.

92) Salliot C, Zeller V, Peuchal X, et al. Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: report of 4 French cases. *J Infect Dis.* 2006; 38(3): 192–234.

93) McClure J, Conly J, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin susceptible from -resistant staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3): 1141–4.

94) Prévost G, Mourey L, Colin DA, et al. Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;257: 53–83.

95) Chambers HF. Community-associated MRSA—resistance and virulence converge. *N Engl J Med.* 2005;352(14): 1485–7.

96) Cunnington A, Brick T, Cooper M, et al. Severe invasive Panton-Valentine leucocidin positive *Staphylococcus aureus* infections in children in London, UK. *J Infect.* 2009;59(1):28–36.

97) Dufour P, Gillet Y, Bes M, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* 2002;35(7): 819–24.

98) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 2003;9(8): 978–84

99) Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 1999;29(5): 1128–32

100) Jayasinghe L, Bayley H. The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. *Protein Sci.* 2005;14(10): 2550–61.

101) McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes

in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(12): 6147–9.

102) Oishi K, Baba T, Nakatomi Y, et al. A latex agglutination assay for specific detection of Panton–Valentine leukocidin. *J Microbiol Methods*. 2008; 75(3): 411–15.

103) Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, et al. Structural Model of the Pre-pore Ring-like Structure of Panton-Valentine Leukocidin: Providing Dimensionality to Biophysical and Mutational Data. *J Biomol Struct Dyn*. 2010; 28(1):1–12.

104) Song L, Hobaugh MR, Shustak C, et al. *Science*. 1996; 274(5294): 1859–66.

105) Kaneko J, Kimura T, Kawakami Y, et al. Panton-Valentine leukocidin genes in phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(11): 1960–2.

106) Nakagawa S, Taneike I, Mimura D, et al. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine leukocidin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(4):995–1002.

107) Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. *PLoS Pathog*. 2010; 8;6(1):e1000715

108) Prévost G, Supersac C, Colin DA. The ntw family of leukotoxins from *Staphylococcus aureus*: structural and biochemical properties. In *Bacterial Protein Toxins*. Zbl. Bakt. suppl. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1994; 24: 284–93.

109) König B, Prévost G, König W. Composition of staphylococcal bicomponent toxins determines pathophysiologic reactions. *J Med Microbiol*. 1997;46(6): 479–85

110) De Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, et al. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis*. 2004; 190(8): 1506–15.

111) Tristan A, Benito Y, Montserret R, et al. The Signal Peptide of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine Leukocidin LukS Component Mediates Increased Adhesion to Heparan Sulfates. *PLoS One*. 2009;4(4):e5042.

112) Colin DA, Mazurier I, Sire S, et al. Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun*. 1994;62(8):3184–8.

113) Kato I, Noda M. ADP-ribosylation of cell-membrane proteins by staphylococcal alpha-toxin and leukocidin in rabbit erythrocytes and polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Lett.* 1989;255(1): 59–62.

114) Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, et al. Neutralization of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis.* 2004; 189(2): 346–53.

115) Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton–Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 2005; 115:3117–27.

116) Couppie P, Prévost C. Les Icutotoxines staphylococciques. *Ann. Dermatol. Venetol.* 1997;124: 328–38.

117) Noda M, Kato I, Hirayama T, et al. Fixation and inactivation of staphylococcal leukocidin by phosphatidylcholine and ganglioside G-M I in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1980;29(2): 678–84.

118) Noda M, Kato I. Mode of action of staphylococcal leukocidin: relationship between binding of 125-I-labelled Sand F components of leukocidin to rabbit polymorphonuclear leukocytes and leukocidin activity. *Infect. Immun.* 1981;34(2): 362–7.

119) Staali L, Monteil H, Colin DA. The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membr. Biol.* 1998;162(3): 209–16.

120) Szmigielski S, Prévost G, Monteil H, et al. Leukocidal Toxins of *Staphylococci*. *Zentralbl Bakteriologie.* 1999; 289(2): 185–201

121) Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, et al. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse–Friderichsen syndrome in children. *New Engl J Med.* 2005;353(12): 1245–51

122) Clark J. A brief review of Panton-Valentine leukocidin producing staphylococcal infections in the intensive therapy unit. *Curr Anaesth Crit Care.* 2008;19(5):330–2.

123) Ward PD, Turner WH. Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* 1980; 28(2): 393–7.

124) Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, et al. 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; 42(5): 2080–4.

125) Herold BC, Immergluck LC, Maranan M, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no predisposing risk. *JAMA*. 1997;279(8):593–8.

126) Ito T, Ma XX, Takeuchi F, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7): 2637–51.

127) Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(5): 1323–36.

128) Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, et al. A novel type of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(4): 1147–52.

129) Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*. 2002;186(9): 1344–7.

130) Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, et al. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type VT or SCCmec type IV. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9): 4719–30.

131) Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, et al. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11): 3574–9.

132) Chen CJ, Huang YC. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005;38(6):376–82.

133) Shukla SK. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and its Emerging Virulence. *Clin Med Res*. 2005;3(2):57–60.

134) Gupta K, Macintyre A, Vanasse G, et al. Trends in Prescribing - Lactam Antibiotics for Treatment of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3930–4.

135) Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006;355(7): 666–74.

136) Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(1): 7687–92.

137) Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7): 1955–63.

138) Kılıç A. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 24–8 Haziran 2008, Ankara. Kongre Kitabı, PNL6, 85–90.

139) Kılıç A, Li H, Stratton CW, et al. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types of, as Well as Pantone-Valentine Leukocidin Occurrence among, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Children and Adults in Middle Tennessee. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12): 4436–40.

140) De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus*: A Paradigm of Adaptive Power. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(5): 428–35.

141) Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Review. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(2): 92–7.

142) Tristan A, Ferry T, Durand G, et al. Virulence Determinants in Community and Hospital Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect.* 2007;65(2): 105–9.

143) Cockfield JD, Pathak S, Edgeworth JD, et al. Rapid Determination of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineages. *J Med Microbiol.* 2007;56(5): 614–9.

144) Naimi TM, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of Community- and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *JAMA.* 2003;290(22):2976–84.

145) CDC –Issues in healthcare settings-Antimicrobial resistance-CA-MRSA Information for clinicians.

146) Shopsis B, Mathema B, Martinez J, et al. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *J Infect Dis.* 2000;182(1):359–62

147) Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis. In: Crossley K.B, Archer GL.(eds): *The Staphylococci in Human Disease* Churchill Livingstone, New York. 1997:253–83.

148) Weller TM. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J Hosp Infect.* 2000;44(3): 160–72.

149) Struelens MJ, Bax R, Deplano A, et al. Concordant clonal delineation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting, *J Clin Microbiol.* 1993;31(8): 1964–70.

150) Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1661–9.

151) Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2): 407–15.

152) Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4): 1083–9.

153) Tang YW, Waddington MG, Smith DH, et al. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(4): 1347–51.

154) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Pulsed-field gel electrophoresis, In: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989. 650–9.

155) Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology, In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications.* American Society of Microbiology, Washington DC. 1993: 563–83.

156) Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(3): 551–5.

157) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9): 2233–9.

158) Zuccarelli AJ, Roy I, Harding GP, et al. Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol.* 1990;28(1): 97–103.

159) Boyce JM, Opal SM, Potter-Bynoe G, et al. Spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis. *Clin Infect Dis.* 1993;17(3): 496–502.

160) Schlichting C, Branger C, Fournier JM, Witte W et al. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2): 227–32.

161) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect Cont Hosp Epidemiol.* 1997;18(6): 426–39.

162) Reed KD, Stemper ME, Shukla SK. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of MRSA. *Methods Mol Biol.* 2007;391: 59–69.

163) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007

164) Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. 3. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 2002;425–54;649–712.

165) Durmaz R, Köksal F, Hoşoğlu S ve ark. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Staphyococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Moleküler Tiplendirmesinde Kullanılacak “Pulsed Field Gel Electrophoresis “(PFGE) Yöntemlerinin Standardizasyonu ve Kit Formatı Haline Getirilmesi. Proje No: 106S211 (SBAG–3459). 2009.

166) Goering RV, Duensing TD. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of *Staphylococci*. *J Clin Microbiol.* 1990;28(3): 426–9.

167) Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8): 520–32.

168) Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med.* 1941; 68: 851–75.

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

170) Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2): 178–82.

171) Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic and therapeutic Odyssey. *Clin Infect Dis*. 2005;40(4): 562–73.

172) Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(6): 1000–18.

173) Zetola N, Francis JS, Nuernberger EL, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(5): 275–86.

174) Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet*. 2006; 368(9538): 874–85.

175) Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, et al. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Ann Emerg Med*. 2009; 53(3): 358–65.

176) Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*. 2001; 32 (2): 114–32.

177) Bell JM, Turnidge JD. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998–1999. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(3): 879–81.

178) Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(9): 1627–34.

179) Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H. Metisilin Dirençli ve Duyarlı *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları. *İnfeksiyon Dergisi* (Turkish Journal of Infection). 2007; 21 (4): 187–91.

180) Arıdoğan A, Atasever L, Bal C. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Dirençleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2004; 34(1): 20–3.

181) Aydın N, Gültekin N, Eyigör M. Klinik Örneklerimizden İzole edilen *Stafilokokların* Antibiyotik Direnci. *ADÜ Tıp Fakültesi Derg*. 2001; 2(3) : 21–6.

182) Altun B, Kocagöz S, Haşçelik G. Çeşitli Hastanelerde İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Fusidik Asit ve Sık Kullanılan Diğer Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.* 2003; 33(1): 8–11.

183) Ekşi F, Balcı İ, Gayyurhan ED. Klinik Örneklerimizden Soyutlanan *Staphylococcus aureus* Suşlarının Metisilin direncinin belirlenmesi ve Antimikrobiyal İlaçlara Duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection).* 2007; 21 (1): 27–31.

184) Durmaz B, Durmaz R, Şahin K. Methicillin resistance among Turkish isolates of *S.aureus* strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents. *J Hosp Infect.* 1997;37(4):325–9.

185) Gürsoy C, Ersoy Y, Günel S. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumlarının Değerlendirilmesi. *Ankem Derg.* 2009; 23(1):26–9.

186) Duman Y, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Antimikrobiyallere Direnç Durumu. *İnönü Üniv. Tıp Fak Derg.* 2009;16(3): 145–8

187) Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med.* 2003; 343(23): 1703–14

188) Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol.* 2005; 175(6):3907–19.

189) Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(5): 545–51.

190) Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2008;16(8): 361–9.

191) Chini V, Petinaki E, Foka A, et al. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(1): 29–34.

192) Popovich KJ, Weinstein RA. Commentary: The graying of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(1): 9–12.

193) Otter JA, French GL. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(12): 753–5.

194) Boyce JM. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of health care-associated infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46(6): 795–8

195) Baggett HC, Hennessy TW, Rudolph K, et al. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*. 2004;189(9): 1565–73

196) McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(11): 5113–20.

197) Diep BA, Carleton HA, Chang RF, et al. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2006; 193(11):1495–503.

198) Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006; 367(9512):731–9.

199) Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008; 8(6): 747- 63.

200) Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001–2003. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25(4): 343–8.

201) Valsesia G, Rossi M, Bertschy S, et al. Emergence of SCCmec type IV and SCCmec type V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? *J Clin Microbiol*. 2010; 48(3): 720–7.

202) Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(6): 1620–7.

203) Tristan A, Bes M, Meugnier H, et al. 2007 Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(4): 594–600.

204) Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, et al. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet*. 2005;365(9466): 1256–8.

205) Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High levels of antibody to Pantone-Valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clin Infect Dis*. 2010;51(10): 1138–46

206) Cheung AS, Aboltins CA, Daffy JR, et al. Necrotizing pneumonia due to Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Med J Aust*. 2008; 188(6):373.

207) Kalka-Moll WM, Lee JC, Fabri M, et al. Intrafamilial outbreak of subcutaneous abscesses caused by PVL-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2008; 57(3): 278–280.

208) Kuehnert M, Kruszon-Moran D, Hill HA, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *J Infect Dis*. 2006; 193(2):172–9

209) Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Pantone-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections in Auckland, New Zealand. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3470–4

210) Blaine KP, Tuohy MJ, Wilson D, et al. Progression to bacteremia in critical care patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing Pantone-Valentine leukocidin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(1):28–33.

211) Chiu YK, Lo WT, Wang CC. Risk factors and molecular analysis of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization and infection in children. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 45(3): 208–13

212) Centers for Disease Control and Prevention. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among healthy newborns—Chicago and Los Angeles County, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2006; 55(12): 329–32.

213) Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, et al. Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. *J Infect Dis*. 2004; 190(10): 1730–38.

214) Saiman L, O’Keefe M, Graham PL, et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(10): 1313–19.

215) Bratu S, Eramo A, Kopec R, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(6): 808–13.

216) Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD, et al. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections. *Am J Infect Control*. 2005; 33(7): 385–91.

217) Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, et al. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(10): 1460–66.

218) Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, et al. Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leukocidin gene in southeastern Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(6): 419–22.

219) Regev-Yochay G, Rubinstein E, Barzilai A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(3): 453–56.

220) Sax H, Posfay-Barbe K, Harbarth S, et al. Control of a cluster of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J Hosp Infect*. 2006; 63(1): 93–100.

221) David MD, Kearns AM, Gossain S, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect*. 2006; 64(3): 244–50.

222) Ramdani-Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, et al. Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algeria hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(3): 1083–5.

223) Witte W, Bräulke C, Cuny C, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(1): 1–5.

224) Vivoni AM, Diep BA, de Gouveia Magalhaes AC, et al. Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian University Hospital: identification of international circulating lineages. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(5): 1686–91.

225) Kaltsas A, Guh A, Mediavilla JR, et al. Frequency of Panton-Valentine Leukocidin-Producing Methicillin-Sensitive *Staphylococcus* Strains in Patients with Complicated Skin and Soft Tissue Infection in Bronx, New York. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8): 2992–5

226) Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, et al. Emergence of virulent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(7): 3341–5.

227) Takano T, Higuchi W, Otsuka T, et al. Novel Characteristics of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Belonging to Multilocus Sequence Type 59 in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):837–45

228) Cupane L, Pugacova N, Berzina D, et al. Patients with Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012;3(1):48–55

229) Health Protection Agency: PLV-*Staphylococcus aureus* infections: an update. Health protection report. 2011, 5, News Archives

230) Moussa BL, Sanni A, Dagnara AY, et al. Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. *Med Mal Infect.* 1999; 29(11): 689–96.

231) Holmes A, Ganner M, McGuane S, et al. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5): 2384–90.

232) Hidron AI, Low CE, Honig EG, et al. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9(6): 384–92.

233) Gillet Y, Vanhems P, Lina G, et al. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Pantone- Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(3): 315–21.

234) Bubeck WJ, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, et al. Pantone-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis.* 2008; 198(8):1166–70.

235) Olsen RJ, Kobayashi SD, Ayeras AA, et al. Lack of a major role of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin in lower respiratory tract infection in nonhuman primates. *Am J Pathol.* 2010; 176(3):1346–54.

236) DeRyke CA, Lodise TP, Rybak MJ, et al. Epidemiology, treatment and outcomes of nosocomial bacteremic *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Chest.* 2005; 128(3): 1414–22.

237) Kollef MH, Micek ST. *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Chest.* 2005; 128(3): 1093–7.

238) Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Annals of Intensive Care* 2011; 1(52):1-7.

239) Li Z, Stevens DL, Hamilton SM, et al. Fatal *S. aureus* Hemorrhagic Pneumonia: Genetic Analysis of a Unique Clinical Isolate Producing both PVL and TSST-1. *PLoS ONE*. 2011; 6(11): e27246

240) Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, et al. Activity of Ceftaroline and Epidemiologic Trends in *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from 43 Medical Centers in the United States in 2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9): 4154-60.

241) Akoğlu H, Zarakolu P, Altun B ve ark. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde 2004-2005 Yıllarında İzole Edilen Hastane Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Epidemiyolojik ve Moleküler Özellikleri. *Mikrobiyol Bül.* 2010; 44(2): 343-55.

242) Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentine lökositidin (PVL) varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bül.* 2007;41: 357- 62.

243) Baran CB, Mutlu D, Baysan BÖ ve ark. Ayaktan sağlık hizmeti alan hastalardan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında panton-valentin lökositidin geni ve scmec gen kaseti tiplerinin araştırılması ve izolatların genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bül.* 2010; 44(4): 533-45

244) Kırdar S, Arslan U, Tuncer İ ve ark. Hastane Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* Suşları Arasında Klonalitenin Ve Panton-Valentin Lökositidin Toksininin Araştırılması. *Mikrobiyol Bül.* 2009; 43: 529-33

245) Cirit OS, Yıldırım T, Çoban AY. *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Panton-Valentin Lökositidin Varlığının Araştırılması. *Balkan Med J.* 2011; 28: 119-24.

246) Şimşek M. (2010) Klinik Örneklerden İzole Edilen MRSA Suşlarında Panton-Valentine Lökositidin Virülans Faktörünün Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi (Danışman: Doç. Dr. Nuran Delialioğlu)

247) Eryonar B. (2008) *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Panton-Valentin Lökositidin Varlığının Polimeraz Zincir Tepkimesi Yöntemi İle Araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. Uzmanlık tezi (Danışman: Prof.Dr. Zeynep Gülay)

248) Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, et al. Investigation of Pantone-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist.* 2008;14(3): 203–10

249) Öksüz L, Gürler N, Güner S ve ark. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suslarında Pantone-Valentine Lökosidin (PVL) Varlığının Araştırılması: Ön Çalışma. 23. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi. Çesme-İzmir, 28 Mayıs–01 Haziran 2008.

250) Kilic A, Uskudar GA, Senses Z, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) characterization and Pantone-Valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008; 94(4):607–14.