



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİK-D-2011-0001

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA PANTON-
VALENTİNE LÖKOSİDİN (PVL) GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzman Vet. Hek. Şebnur HAZIMOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN-2011

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2011-0001

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA PANTON-
VALENTİNE LÖKOSİDİN (PVL) GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzman Vet. Hek. Şebnur HAZIMOĞLU

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA

AYDIN-2011

ÖNSÖZ

Staphylococcus aureus, taşıdığı virülans faktörleri ve kendisine karşı kullanılan antibiyotiklere hızlı direnç geliştirme potansiyeli nedeniyle günümüzün en önemli infeksiyon etkenlerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) birçok antibiyotiğe dirençli bir *S. aureus* suşudur. MRSA infeksiyonları olağan *S. aureus* infeksiyonlarına oranla daha şiddetli olmakla birlikte, antibiyotikler ile tedavi edilmeleri zordur ve kontrol altına alınmadan, ciddi bir problem haline gelebilirler. MRSA suşları tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da artık insanlarda olduğu kadar hayvanlarda da bildirilmektedir.

Metisilin dirençli stafilokoklarda (MRS), metisilin duyarlı stafilokoklardan (MSS) farklı olarak, Stafilokokal Kromozomal Kaset *mec* (SCC*mec*) olarak isimlendirilen bir direnç adası bulunmaktadır. SCC, “Stafilokokal Kromozomal Kaset” için; *mec* ise, metisilin direncine neden olan genetik elemanı simgelemek için kullanılmaktadır. Son yapılan sınıflandırmada bu komplekslerin yapısına göre SCC*mec* sekiz tipe ayrılmaktadır: SCC*mec* tip I, II ve III “hastanede kazanılmış” (HK MRS) klonlar, SCC*mec* tip IV, V ve VII ise “toplumda kazanılmış” (TK MRS) klonlar olarak tanımlanmaktadır. İnsanlar hayvanlarda bulunan MRSA suşları ile infekte veya kolonize olabildikleri gibi, bunun tam tersi olarak, hayvanlarda insan suşlarını taşıyabilir ya da infekte olabilirler. Bu nedenle MRS taşıyıcılığının izlenmesinde, hayvandan insana (zoonozis) ya da insandan hayvana (humanozis) geçişin aydınlatılması önemlidir. MRS suşları özellikle atlar ve domuzlarda olmak üzere tüm evcil hayvanlarda, hatta yarasa, papağan ve çinçillalarda da bildirilmektedir.

Panton-Valentine Lökosidin (PVL) özellikle toplum kökenli cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ile akut nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan bir toksindir. PVL, aynı zamanda hem metisilin duyarlı hem de metisilin dirençli stafilokok suşları tarafından üretilen önemli bir virülans faktörüdür. PVL, birbiri ile sinerjik etki gösteren iki komponentli bir toksin olup, konak lökositlerinin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olmaktadır. Bu nedenle, PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte ve ölümlerle sonuçlanabilmektedir. PVL, özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL pozitif *S. aureus* suşlarının hastanelerde yayılabildiğini, hatta hastane kaynaklı salgınlara neden olabildiğini göstermektedir. Bu suşların varlığı ve sıklığı üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle Avrupa ve Amerika’da PVL pozitif *S. aureus* izolatlarının artmakta olduğunu göstermektedir. PVL genlerini taşıyan suşların insan ve hayvan popülasyonlarında hızlı bir şekilde yayılabildiği bilinmekle birlikte; hayvanlarda, insanlara oranla bu konuda daha az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada insan ve sığırlardan izole edilmiş olan *S. aureus* suşlarında önemli virülans faktörlerinden birisi olan PVL genlerinin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi, bu izolatların SCC*mec* tipi ve *spa* analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF-11013 no’lu proje) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	
1. 1. <i>S.aureus</i> ' un Ayırıcı Özellikleri	2
<i>S.aureus</i> ' un Sınıflandırılması	2
1. 3. <i>S. aureus</i> ' un Kültür, Üreme Özellikleri ve İdentifikasyon	3
1. 4. <i>S. aureus</i> ' un Genom Yapısı	4
1. 5. <i>S. aureus</i> ' un Patogenezine Katkıda Bulunan Virulans Faktörleri	4
1. 5. 1. Hücre İle İlgili Faktörler	5
1. 5. 1. 1. Adezinler	5
1. 5. 1. 2. Protein A	7
1. 5. 1. 3. Kapsüler Polisakkaritler	7
1. 5. 1. 4. Peptidoglikan ve Lipoteikoikasit	8
1. 5. 1. 5. Biofilm Oluşumu İle İlgili Yüzey Bileşenleri	8
1. 5. 2. Ekstrasellüler Protein Toksinler	9
1. 5. 2. 1. Hemolizinler	9
1. 5. 2. 1. Lökotoksinler	11
1. 5. 2. 2. 1. PVL Nedir	11
1. 5. 2. 2. 2. PVL Tarihçesi	11
1. 5. 2. 3. 3. Etki Mekanizması	19
1. 5. 2. 3. 4. Klinik Etkileri	20
1. 5. 2. 3. 5. Epidemiyoloji	20

1. 5. 2. 3. Eksfoliatif Toksin	22
1. 5. 2. 4. Enterotoksin	23
1. 5. 2. 5. Toksik Şok Sendromu Toksini	23
1.5. 3. Enzimler	23
1. 5. 3. 1. Katalaz	23
1. 5. 3. 2. Koagülaz	23
1. 5. 3. 3. Lipaz	24
1. 5. 3. 4. Hiyalüronidaz	24
1. 5. 3. 5. Fibrinolizin	24
1. 5. 3. 6. Fosfolipaz C	24
1. 5. 3. 7. Deoksiribonükleaz	24
1. 5. 3. 8. Beta-laktamaz	25
1. 6. Antibiyotik Direncinin Özellikleri.....	26
1. 7. <i>S. aureus</i> ' un Tanısında Kullanılan Laboratuvar Testleri.....	27
1. 7. 1. Fenotipik Yöntemler	27
1.7.1. 1. Gram Boyama	28
1.7.1. 2. Kültür	28
1.7.1. 3. Katalaz Testi	29
1.7.1.4. Koagülaz Testi	29
1.7.1. 5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	29
1.7.1. 6. Serolojik Testler	29
1. 7.2. Genotipik Yöntemler	29
1. 7. 2. 1 İtilmiş Alan (Pulsed Field) Jel Elektroforezi (PFGE)	30
1. 7. 2. 2. Stafilokokal Kromozomal Kaset <i>mec</i> (SCC <i>mec</i>)	31
1. 7. 2. 3. Stafilokokal Protein A (<i>spa</i>) Dizi Tipleme	33
1. 7. 2. 4. Multilokus Dizi Tipleme (Multilocus Sequence Typing, MLST)	33

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereç	37
2. 1. 1. İzolasyon Örnekler	37
2. 1. 1. 1. Süt	37
2. 1. 2. 2. Burun Sıvap	37
2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solüsyonlar, ve Antibiyotik Diskleri	37
2. 1. 2. 1. Besiyerleri	37
2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar Base.	38

2. 1. 2. 1. 2. Mannitol Salt Phenol Red Agar	38
2. 1. 2. 1. 3. Mueller-Hinton Agar	39
2. 1. 2. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth	39
2. 1. 2. 1. 5. Triptone Soya Broth	39
2. 1. 2. 1. 6. Stuart Transport Medium	40
2. 1. 2. 2. Solusyonlar	40
2. 1. 2. 2. 1. EDTA	40
2. 1. 2. 2. 2. TBE Buffer	40
2. 1. 2. 2. 3. Gel Loading Buffer	41
2. 1. 2. 2. 4. Tris	41
2. 1. 2. 3. Antibiyotik Diskleri	41
2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	41
2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar	41
2. 1. 3. 2. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	41
2. 1. 3. 3. Primerler	41
2. 1. 4. Elektroferez Cihazı	43
2. 1. 4.1. Agorose Jel Hazırlanışı	43
2. 1. 4. 2. Marker	43
2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür	43
2. 1. 4. 4. Standart Suşlar	43
2. 2. Yöntem	43
2. 2. 1. Örneklerin Alınması	43
2. 2. 1. 1. Sütler	43
2. 2. 1. 2. Burun Sıvap	44
2. 2. 2. MRSA İzolasyonu	44
2. 2. 2. 1. Fenotipik İdentifikasyon	44
2. 2. 2. 1. 1. Katalaz Testi	44
2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Duyarlılık Testi	44
2. 2. 2. 1. 3. Koagulaz Testi	45
2. 2. 2. 1. 4. Sefoksitin Duyarlılık Testi	45
2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon	45
2. 2. 2. 2. 1. PCR	46
2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların Elektroferez Tankına Yüklenmesi	50
2. 2. 2. 2. 3. Yürütme	50

2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme	50
3. BULGULAR	
3. 1. MRSA Taşıyıcılığı	51
3. 1. 1. Sığır Sütlerinde	51
3. 1. 2. İnsan ve Sığır Nazal Sıvıplarında	51
3. 2. PCR	51
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ	61
ÖZET	62
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	80
TEŞEKKÜR	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1. <i>S.aureus</i> ' un tarihçesinde önemli gelişmeler.....	1
Çizelge 1. 2. <i>S. aureus</i> türlerinin sınıflandırılması.....	2
Çizelge 1. 3. <i>S. aureus</i> tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler.....	25
Çizelge 1. 4. <i>S. aureus</i> 'ta belirlenen SCC <i>mec</i> tipleri.....	31
Çizelge 1. 5. Farklı SCC <i>mec</i> tiplerinin özellikleri.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1. <i>S. aureus</i> 'un en önemli virulens faktörleri	25
Şekil 1. 2. β -laktamların etki mekanizması genlerinin sınıflandırılması	26
Şekil 1. 3. <i>S. aureus</i> 'un mikroskopik görünümü	28
Şekil 1. 4. Mannitollü tuzlu besi yerinde üreyen <i>S. aureus</i> ve <i>S. epidermidis</i>	28

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3. 1. Metisillin duyarlı ve dirençli birer <i>S. aureus</i> suşu	51
Resim 3. 2. β <i>mec</i> primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR	52
Resim 3. 3. <i>nuc</i> primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR	52
Resim 3. 4. PVL primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR	52
Resim 3. 5. PVLspesifik PCR	52
Resim 3. 6. Nucleotid Blast ile PVL geni dizisi sorgulama sonucu	53
Resim 3. 7. PVL pozitif suşun SCC <i>mec</i> tipi	53
Resim 3. 8. <i>spa</i> PCR	54
Resim 3. 9. PVL pozitif MRSA suşunun DNA örneğinde baz dizisinin gösterilmesi	54

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACME:	Arjinin dekompozisyonu sağlayan ikinci bir gen kümesi
BHIA:	Brain Heart Infusion Agar
BHIB:	Brain Heart Infusion Broth
CC	Clonal Complex
ccr:	Kaset Kromozom Rekombinaz
Clf:	Fibrinojen bağlayan protein
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT:	Kalifornia Mastitis Test
Cna:	Kemik sialoprotein bağlayan protein
CPs:	Kapsüler polisakkarit
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DNAaz:	Deoksiribo Nükleaz
EbpS:	Elastin bağlayan protein
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic asit
EIA:	Enzyme Immunoassay
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMRSA:	Epidemik metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
Fnb:	Fibrinlektin bağlayan protein
FOX:	Sefoksitin
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HK-MRSA:	Hastane kökenli metisilin dirençli <i>S. aureus</i>
I:	Orta derecede duyarlı
Ig:	Immunoglobulin
kbp:	Kilo baz pair
kDa:	Kilo dalton
KNS:	Koagulaz negatif stafilokok
KPS:	Koagulaz pozitif stafilokok

MHA:	Mueller- Hinton Agar
MLST:	Multilokus sequence tipleme
MPCR:	Multipleks PCR
MRKNS:	Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok
MRS:	Metisilin dirençli stafilokok
MRSA:	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA:	Mannitol Phenol Red Salt Agar
MSCRAMM:	Microbial Surface Component Reacting with Adherence Matrix Molecules
MSS:	Metisilin duyarlı stafilokok
MSSA:	Metisilin duyarlı <i>S. aureus</i>
NAG:	N-Asetil Glukozamin
NAM:	N-Asetil Muramik Asit
PBP:	Penisilin bağlayan protein
PBS:	Fosfat Buffer Salin
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVL:	Panton- Valentine Lökosidin
R:	Dirençli
rRNA:	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
S:	Duyarlı
SCC:	Stafilakokal kromozomal kaset
SCCmec:	Stafilokokal kromozomal kaset <i>mec</i>
TK-MRSA:	Toplum kökenli metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
TSB:	Tripton Soya Broth
TSSS:	Stafilokokal toksik şok sendromu
TSST:	Toksik şok sendromu toksini
VDSA:	Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus insan ve hayvanlarda ciddi ve invaziv hastalıklara neden olabilen önemli bir patojendir. 1878’de Koch ilk kez farklı hastalıklara neden olan Gram pozitif kümeler oluşturan bu mikroorganizmayı bildirirken; 1881’de Ogston üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan stafilocokları insanlarda irinli lezyonlardan izole etmiş (Ogston 1881) ve 1884’de Rosenbach stafilocok türlerini pigment oluşturmalarına göre ayırmıştır (Rosenbach 1884). Antibiyotiklerin kullanılmasından önce, invaziv *S. aureus* infeksiyonları mortaliteye sebep olurken; 1940’lı yıllarda penisilinin kullanıma girmesi ile bu mikroorganizmadan kaynaklanan ölüm vakalarında azalma görülmüştür. 1950’li yılların başında ilk penisilin dirençli suş izole edilirken daha sonraları yarı sentetik penisilin türevleri kullanılmaya başlanmış ancak stafilocoklar bunlara da direnç göstermeye başlamıştır. *S. aureus*’un tarihçesinde en önemli gelişmeler Çizelge 1. 1.’de özetlenmiştir.

Çizelge 1. 1. *S. aureus*’un tarihçesinde en önemli gelişmeler

Tarih	Olay	Kaynak
1881	İnsan irininde üzüm salkımı şeklinde görünen mikroorganizma identifiye edildi,	Ogston 1881
1884	Rosenbach stafilocokları pigment özelliklerine göre guruplandırdı,	Rosenbach 1884
1940’lı yılların öncesi	Hekimler invaziv stafilocok infeksiyonlarında görülen önemli mortalite karşısında çaresiz kaldılar,	Fluit ve Schmitz 2003, Richardson ve ark. 1994
1950’li yıllar	Çoklu dirençli <i>S. aureus</i> ortaya çıktı, direnç faj 80a yolu ile yayılıyordu,	Barber 1961
1959	Penisilin dirençli <i>S. aureus</i> ’un tedavisinde metisilinin geliştirilmesi,	Richardson ve ark. 1994
1961	Metisilin direnci <i>S. aureus</i> ’un laboratuvar suşlarında bildirildi,	Barber 1961
1963	İlk doğal olarak görülen metisilin dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA) rapor edildi,	Jevons 1963
1960-2000	Stafilocoklarda makrolid, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozid ve fluorokinolon dirençleri bildirildi	Lyon ve ark. 1987, Shanson 1961
1980’li yıllar	Metisilin direncinin genetik temeli açıklandı, PBP2a karakterizasyonu yapıldı.	Hartman ve Tomasz 1984, Matsushashi ve ark. 1986

1. 1. *S. aureus*'un Ayırıcı Özellikleri

16S rRNA sekans analizine dayanarak, taksonomik olarak *Staphylococcaceae* familyası *Bacillaceae* ve *Listeriaceae* familyaları arasında yer alır. *S. aureus* genomu yaklaşık olarak 2,8 Mbp uzunluğunda olup; profajlar, transpozonlar ve plazmid gibi ekstra kromozomal genetik elementler içerir. *S. aureus* morfolojik olarak üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan, hareketsiz, fakültatif anaerob bir bakteridir.

S. aureus suşlarının çoğunluğu 1-11 farklı polisakkarit kapsül (PK) üretebilmektedir. Tip 5 ve Tip 8 çoğu insan infeksiyonlarından sorumludur (Franklin 1998, Fong ve Kolia 2003). *S. aureus*, sitrat veya oksalat ile muamele edilmiş plazmayı pıhtılaştırıcı protein benzeri bir enzim olan koagülazı üretmektedir. Serbest olarak salınabilen koagülaz protrombini bağlamakta ve fibrin polimerizasyonunu başlatmaktadır. Koagülaz testi rutin teşhis laboratuvarlarında genellikle daha az invaziv olan koagülaz negatif stafilokokları (KNS) koagülaz pozitif stafilokoklardan (KPS) ayırmak için kullanılmaktadır (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 2. *S. aureus*'un Sınıflandırılması

S. aureus, *Staphylococcus* cinsi ve *Staphylococcaceae* ailesinde yer alan bir bakteridir (Çizelge 1. 2.). Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 41 tür saptanmıştır (Trülzsch ve ark. 2007). Stafilokok türlerinin sınıflandırılması Çizelge 1. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 1. 2. Stafilokok türlerinin sınıflandırılması (Todar 1994)

Domain	<i>Bacteriae</i>
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür (insan ve hayvanlarda hastalık yapan en önemli türler)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i>

Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre her geçen gün değişmekle birlikte en az dört grup altında toplanabilirler: i) *S. epidermidis* grubu (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri), ii) *S. saprophyticus* grubu (*S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri), iii) *S. simulans* grubu (*S. simulans*, *S. carnosus* türleri), iv) *S. sciure* grubu (*S. sciure*, *S. lentus* türleri) yer almaktadır. *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır (Tünger 2004, Tünger ve ark. 2005).

1. 3. *S. aureus*'un Kültür, Üreme Özellikleri ve İdentifikasyon

Stafilokoklar aerobik veya mikroaerofilik şartlar altında çoğu bakteriyolojik ortamda en hızlı 37°C'de kolayca ürerler. Katı ortamda oluşan kolonileri yuvarlak, düzgün, kabarık ve parlaktırlar. *S. aureus* genellikle beyazdan altın sarısına kadar değişen renklerde koloniler oluşturmaktadır. *S. aureus* genellikle hemoliz yapmaktadır. Ayrıca anaerobik koklardan olan *Peptostreptococcus* türleri morfolojik olarak sıkça stafilokoklara benzetilmektedir (Brooks ve ark. 2007, Waldvogel 2000).

Ayırt edici besiyeri olan mannitol salt agarda yüksek yoğunlukta tuz varlığında üreyebilen stafilokoklardan *S. aureus*, diğerlerinden mannitolu fermente ederek koloniler etrafında sarı hale oluşturmasıyla ayrılır. Fakat diğer bazı stafilokoklar (örn. *S. saprophyticus*) da mannitolü fermente ederek benzer koloniler oluşturabilir. Mannitol salt agar ve diğer ayırt edici besiyerlerinde üremenin belirlenmesi için 48–72 saat inkubasyon gerekli olabilir. Katalaz ve Gram pozitif koklar içinde *Staphylococcus*, *Micrococcus* zayıf katalaz pozitif olabilen *Rothia* (daha önceden *Stomatococcus* olarak isimlendirilen), *Aerococcus* ve *Enterococcus* yer almaktadır. Stafilokoklar fakültatif anaerop üreme özellikleri, 200 µg/ml lizostafinle erimeleri, 0,04U basitrasine dirençli, 100 µg furazolidona duyarlı, oksidaz negatif, anaerop ortamda glikozdan ve 0,4 µg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturuyor olmalarıyla diğer bakterilerden ayrılır (Cengiz 1999).

Stafilokok identifikasyonunda bir ileri adım koagulaz testidir. Koagulaz testi lam yöntemiyle bağlı, tüp yöntemiyle serbest koagulazın tayini için kullanılır. Lam koagulazı negatif olan stafilokoklar için mutlaka tüp koagulaz testi de uygulanmalıdır. Koagulaz pozitif stafilokokların (KPS) identifikasyonunda Voges-Proskauer ve pyrrolidonyl aminopeptidase (PYR) testleri kullanılır (Forbes ve ark. 2002). Bugün *S. aureus* identifikasyonu için tüp

koagulaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Tüp ve lam koagulaz dışında birçoğunun özgüllük ve duyarlılığı %90'ın üzerinde olan plazma ile kaplı lateks partiküllerin kullanıldığı lateks aglutinasyon, fibrinojen ile duyarlılaştırılmış koyun eritrositlerinin kullanıldığı pasif hemaglutinasyon ile çeşitli florojenik koagulaz testleri de geliştirilmiştir. *S. aureus*'un nükleik asitleri hidrolize eden deoksiribonukleaz (DNaz) ve termostabil endonukleaz enzimleri üretebilmesinden yola çıkarak hazırlanan testlerden de yararlanılmaktadır. Bu yöntemler dışında, toprak, dışkı, burunda aranması amacıyla *S. aureus*'un KNS'lardan farklı olarak mannitolü fermente etme özelliği de kullanılmaktadır. Ancak nadir mannitolü fermente eden KNS'lardan ayırımı için tüp koagulaz testiyle doğrulanmalıdır (Tünger 2004). *S. aureus* identifikasyonu üzerinde diğer çalışılan yöntemler anti protein A antikorları ile kaplı lateks partiküllerin kullanıldığı lateks aglutinasyon, *S. aureus*'un üremesini spesifik olarak inhibe eden alfazurin A boyasının kullanıldığı disk difüzyon, sadece *S. aureus*'un ürettiği bir enzim olan asetilglukozaminidaz antikorlarından yararlanılan enzim immünassay (EIA) ve *S. aureus*'un termostabil endonukleazlarını kodlayan *nuc* geni için özgül problemlerin kullanıldığı deoksiribonukleik asit (DNA) prob ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleridir (Forbes 2002, Tünger 2004).

1. 4. *S. aureus*'un Genom Yapısı

Stafilokokların genomu yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Bakterinin virülansından ve direncinden sorumlu olan genlerin diğer *S. aureus* kökenlerine, başka stafilokok türlerine ve farklı cins Gram pozitif bakterilere en sık aktarılma yolu transdüksiyondur (Tünger 2004).

1. 5. *S. aureus*'un Patogeneze Katkıda Bulunan Virulans Faktörleri

Hemen hemen tüm *S. aureus* izolatları onların patogeneze katkıda bulunan çok sayıda virulans faktörü üretir. Bu virulans faktörlerinin büyük çoğunluğu klinik semptomların (örn. toksik şok sendromu) ortaya çıkmasından sorumludur. Bununla birlikte ciddi *S. aureus* infeksiyonlarının büyük bir çoğunluğu tek bir virulans faktörünün etkisi ile ortaya çıkmaktadır. İnfeksiyon süreci esnasında değişik mekanizmalar ile birlikte gittikçe artan etkiler stafilokokal hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir (Peacock ve ark. 2002).

1. 5. 1. Hücre İle İlgili Faktörler

1. 5. 1. 1. Adezinler

Ekstrasellüler patojenik bir bakteri olan *S. aureus*, infeksiyon sürecinin ilk aşaması olarak kabul edilen kolonizasyonunu sağlayan komponentleri yardımı ile konak hücrenin ekstrasellüler yüzeylerine yapışabilir (Tung ve ark. 2000). Bu yapışma microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM): yapışkan matriks proteinleri olarak tanımlanan mikrobiyal yüzey komponentleri grubu ile ilişkilidir. Bu adesiv moleküller *S. aureus*'un hücre yüzeyinde bulunur. Bu adezinler çoğunlukla hücre duvar peptidoglikanına kovalent olarak sıkıca bağlanmıştır Bunlar:

fibrinojen bağlayan proteinler (*ClfA*, *ClfB* ve *Fbp*),
fibronektin bağlayan proteinler (*FnbA* and *FnbB*),
kemik sialoprotein bağlayan protein (*Bbp*),
kollajen bağlayan protein (*Cna*),
elastin bağlayan protein (*EbpS*) ve
yüzeysel özel adezin proteinleridir (Patti ve ark. 1994).

Fibrinojen bağlayanlar: *S. aureus*'un fibrinojen içeren yüzeylere yapışma yeteneği ve fibrinojenin varlığında kümeler oluşturması kümeleşme faktörleri olan *ClfA* ve *ClfB* bulunmasına bağlıdır (McDevitt ve ark. 1994, Ni Eidhin ve ark. 1998). Bu faktörler özellikle yara ve yabancı cisim infeksiyonlarında çok önemli rol oynarlar (Foster and Hook 1998). *ClfA* deneysel endokarditisin patogenezinde önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (Moreillon ve ark. 1995). *ClfB* hasara uğramış insan nasal epitelyum hücrelerinin yüzeyinde bulunan K10 tip 1 sitokin molekülünü bağlayabilir. Bu nedenle, *ClfB* pek çok vakada stafilokokal infeksiyonlar için risk faktörü olarak bilinen insanlarda nasal taşıyıcılığın gelişmesine yardımcı olur (O'Brien ve ark. 2002). Rekombinant *ClfB* ile farelerin pasif immunizasyonu farelerde *S. aureus*'un nasal kolonizasyonunu azaltabilir. Bundan dolayı, *ClfB* *S. aureus*'un nazal kolonizasyonunu azaltmak için aşılarla katılan ilginç bir komponenttir (Schaffer ve ark. 2006). *Clf*'ler *S. aureus*'un artritise neden olmasında önemli rol oynarlar (Palmqvist ve ark. 2005). Cheung ve ark. (1995) *S. aureus*'un koagulaz sekansı ile önemli oranda benzerlik gösteren *FbpA* geni tarafından kodlanan bir fibrinojen bağlayan protein *Fbp* gösterilmiştir. Bununla birlikte, *Fbp*'nin bir ekzoenzim olan koagulazın aksine bakteriye bağlı

olduğu bildirilmiştir. 1954’de Duthie tarafından *Fbp* “bağlı koagulaz” olarak isimlendirilmiştir (Projan and Novick 1997).

Fibronektin bağlayan proteinler (*Fnb*): *S. aureus* birbirleri ile yakın ilişkili iki gen tarafından kodlanan *FnbA* ve *FnbB* olarak bilinen iki fibronektin bağlayan protein salgılamaktadır (Jonsson ve ark. 1991). İmplant biyomateryaller her zaman fibronektin tabakası ile kaplıdır bu proteinlerin yabancı cisim infeksiyonlarının ilerlemesinde önemli olduğu öne sürülmektedir (Greene ve ark. 1995). Bunlar endokardit ve osteomyelit infeksiyonlarında önemli rol oynarlar (Johansson ve ark. 2001). Üstelik *FnbP*’ler epitel hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar ve osteoblastlar da dahil olmak üzere memeli hücrelerinin invazyonunda önemli rol oynarlar (Lammers ve ark. 1999, Sinha ve ark. 1999).

Kemik sialoprotein bağlayan protein (*Bbp*): Kemik sialoprotein yalnızca kemik ve dentin tabakası üzerinde bulunan ekstrasellüler matriks proteindir (Oldberg ve 1988). *S. aureus*’un bu proteine bağlanması bir hücre yüzey proteini olan Mr 97000’ün kemik sialoprotein-bağlayan proteini (*Bbp*) ile ilişkilidir (Yacoub ve ark. 1994). *Bbp* osteomyelitis ve artrit oluşumunda önemli rol oynayan faktörlerdir (Bremell ve ark., 1991).

Kollagen bağlayan protein (*Cna*): Kollagen pek çok dokuda ekstrasellüler matriksin en önemli bileşenidir. *S. aureus* *Cna* olarak isimlendirilen kollagen bağlayan bir protein salgılar. Bunun, bakterinin kırıkdağa adezyonunda gerekli olduğu gösterilmiştir (Switalski ve ark. 1993). Üstelik, *Cna* deneysel septik artritide önemli bir virulens faktörüdür (Patti ve ark. 1994).

Elastin adhezonu *EbpS*: Elastin doku ve organlara primer rolü uygun şekilde elastikiyet kazandırmak olan önemli bir yapısal proteindir. Elastin salgılanması akciğer, deri, kan damarlarında en yüksek seviyededir, fakat elastin pek çok memeli dokusunda düşük düzeylerde salgılanır. *S. aureus*’un elastine bağlanması elastin bağlayan proteinler olarak isimlendirilen *EbpS* ile ilgilidir (Park ve ark. 1996).

Sınırsız özgüllükte adezyon proteinleri: Özel matriks proteinleri reseptörlerinden başka McGavin ve ark. (1993) tarafından sınırsız özgüllükte ekstrasellüler matriks bağlayan proteinler bildirilmiştir. Bu protein osteopontin, kollagen, kemik sialoprotein, fibronektin,

fibrinogen ve vitronektin gibi pek çok makromoleküle *S. aureus*'un düşük affinite ile bağlanmasını kolaylaştırır.

1. 5. 1. 2. Protein A

Protein A elastin, kollagen, fibronektin bağlayan proteinler, “clumping faktör” gibi kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasını sağlayan en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği bazı immunglobulinlerin (IgG1, IgG2, IgG4) Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplementer ve antifagositer etkinliği vardır. Yani protein A immunglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak antikorlara bağlı fagositozdan, ayrıca hücre dışına salınan protein A'da aynı reseptöre bağlanarak komplemana bağlı vücut savunmasından bakteriyi korur. Protein A, *S. aureus* infeksiyonlarının patogeneziinde önemli bu fonksiyonu dışında, bazı infeksiyon hastalıklarının tanısı amacı ile in vitro deneylerde kullanılabilir. *S. aureus*'un nonspesifik taşıyıcı olarak kullanıldığı bu testlere koaglutinasyon adı verilir ve sadece antijen aramak amacı ile kullanılan, aglutinasyon temeline dayalı bir tanı yöntemidir (Tünger ve ark. 2005). Stafilokokkal protein A'nın koagulaz ve nukleaz aktiviteleri ile büyük oranda korelasyon göstermesi, antifagositik etki yaratması ve antibiyotik duyarlılığını azaltması gibi özellikleri nedeni ile önemli bir patojenite kriteridir (Tünger 2004, Moreillon ve ark. 2005).

1. 5. 1. 3. Kapsüler Polisakkaritler

Bakteriyel kapsüler polisakkaritler (CPs) mikrobiyal infeksiyonların oluşmasında önemli virulens faktörlerindendirler. *S. aureus* klinik izolatlarının %90'ından fazlasında polisakkarid yapıda mikrokapsül bulunmaktadır. Bu kapsül bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine ve yabancı cisimlere adrensini sağlar. Günümüze kadar tanımlanan 11 kapsüler serotipin içinde özellikle tip 8 ve tip 5 insan infeksiyonlarının %75'inden sorumludur (Franklin 1998, Fong ve Kolia 2003, Moreillon ve ark. 2005). Ayrıca toksik şok sendrom toksini üretimi ile tip 8'in, metisiline direnci ile de tip 5'in yakın ilişkide oldukları gösterilmiştir (Koneman ve ark. 1997).

1. 5. 1. 4. Peptidoglikan ve Lipoteikoikasit

Bakteri kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Peptidoglikan tabaka N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramikasit (NAM) polimerlerinden oluşur. Bu tabaka mikroorganizmaların ozmotik stabilitesini sağlar ve bakteriye şeklini verir. Ayrıca insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir, yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, kompleman aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorf nükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmasına ve apse oluşumuna yol açar. Vücudun önemli savunma sistemlerinden lizozim enziminin de hedefi peptidoglikan tabakadır (Koneman 1997). Sadece Gram pozitif bakteri duvarında bulunan teikoik asit mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek stafilokokların infeksiyon bölgesine yapışmasını sağlar. Stafilokokların teikoik asidi türe özgüdür. *S. aureus*'da ribitol teikoik asit, *S. epidermis*'de gliserol teikoik asit bulunur. Teikoik asit tek başına zayıf bir immunojen, ancak peptidoglikan ile birlikte bulunduğu spesifik antikor yanıtını uyarabilir. Bu antikor yanıtının izlenmesi sistemik stafilokok infeksiyonlarının tanısında faydalıdır (Tünger ve ark. 2005).

1. 5. 1. 5. Biofilm Oluşumu İle İlgili Yüzey Bileşenleri

S. aureus'un konak hücrelere kolonizasyonunda ilk adım yapışmadır. Bakteri bunu yüzeyinde bulunan MSCRAMM molekülleri yardımı ile yapabilir, fakat bu amaca ulaşmak için ikinci bir yol biofilm oluşumudur. Bazı bakterilerin en dış bölümünde glikokaliks denilen yapışkan bir tabaka bulunur. Eğer bu glikokaliks tabaka kalın, bakteri yapısı içinde belli bir yeri olan ve hücre duvarına sıkıca yapışık durumda ise buna kapsül adı verilir. Eğer bu tabaka ince, hücre duvarına sıkıca yapışık durumda değil ve kolaylıkla ayrılabilir bir yapı ise; slaym tabakası olarak kabul edilir. Slaym maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup % 40 karbonhidrat, % 27 protein içermektedir. Çok kuvvetli antijenik yapıda olduğundan, tavşanlara şırınga edildiğinde çok yüksek titrede antikor cevabı elde edilir. Slaym pozitif stafilokok suşlarının daha virülan ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slaym faktör hücresel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006). Slaym üretimi stafilokoklarda önemli bir patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu

faktörün mikroorganizmanın konak hücreye veya yapay yüzeylere adezyonunu sağlayarak etkili olduğu gösterilmiştir (Christensen ve ark. 1994, Cengiz ve ark. 2004). Keskin ve ark. (2003) mastitisli inek sütlerinden ve tavuklardaki lezyonlardan izole edilen patojenik KNS suşlarının, sağlıklı hayvanlardan izole edilen kontrol suşlarına oranla daha fazla oranda slaym oluşturdıklarını ve daha adheran olduklarını bildirmişlerdir. Yüzeylerde bulunan fibrin, fibronektin ve slaym faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta, kolonizasyon meydana getirmekte ve bu biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar sepsise yol açmaktadırlar (Karaca ve ark. 2001).

Biofilm ve slaym terimleri birbirleri yerine kullanılabilir (Arciola ve ark. 2002). Slaym faktör mikroorganizmayı kaplayarak vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu maddenin kemotaktik etkisinin de bulunduğu fakat slaym tarafından uyarılan polimorf çekirdekli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmanın, hücre içinde yaşam süresinin uzamasına ve fagositozdan korunmasına neden olmaktadır (Aybay ve ark. 1997). Ayrıca, slaym oluşturan mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda antibiyotik tedavisi başarısızlığına ve kronik infeksiyonlara daha sık rastlanmaktadır (Christensen ve ark. 1994).

1. 5. 2. Ekstrasellüler Protein Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Bunlardan en iyi bilinenleri hemolizinler ve lökositinlerdir (Cengiz ve ark. 1999).

1. 5. 2. 1. Hemolizinler

Hemolizinler, çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak ayrımlar gösterirler. Bu toksinler dört tiptir. Bu dört hemolizin kromozom üzerinde kodlanmıştır ve çoğu *S. aureus* suşunda bulunur. Bunlar alfa, beta, gamma ve delta hemolizinlerdir.

Alfa hemolizin (Alfa Toksin): Bu toksin memeli hücrelerinde (eritrosit, lökosit, trombosit gibi) por oluşumuna neden olarak inflamatuvar yanıtı indükler. Alfa toksin kanlı

agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevrelerindeki beta hemolizden sorumludur. En güçlü membran hasar proteini olup 33 kDa ağırlığındadır. *S. aureus* suşlarının ana hemolizindir. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi yüksektir. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır. Formol ile toksoid haline getirilebilir (Cengiz ve ark. 1999, Peacock 2005, Moreillion 2005, Alen ve ark. 2006).

Beta Hemolizin (Beta Toksin, Sfingomyelinaz C): Stafilokokal sfingomyelinaz olup 35 kDa ağırlığındadır. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Eritrositler üzerindeki etkisi soğukla artar. Fibroblast ve lökosit hücrelerine de toksik etki gösterir. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoid haline getirilebilir (Cengiz ve ark. 1999, Peacock 2005, Moreillion 2005, Alen ve ark. 2006). Alfa ve beta toksin invaziv stafilokok infeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve apse oluşumundan sorumlu olan en önemli toksinlerdir. Beta toksin aynı zamanda B grubu streptokoklar ve *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemolizini arttırıcı etkiye sahip olan CAMP faktörle etkileşen ve bu sinerjik hemolize neden olan yapıdır. Ayrıca bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler.

Gamma Hemolizin (Gamma Toksin): İnsan eritrositleri üzerine orta derecede etkilidir. Tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır. Özellikle stafilokokal kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Peacock 2005, Moreillion 2005, Alen ve ark. 2006).

Delta Hemolizin (Delta Toksin): Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek CAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokokal Toksik Şok Sendromu (TSSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynar. İnsan, tavşan ve maymun eritrositlerine etkilidir. Ayrıca, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri de hasara uğratar. Alfa ve delta toksin insanda hastalık oluşturan stafilokok suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının % 95'inde bunlardan biri, % 82'sinde her ikisi de birlikte bulunabilmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillion 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 2. 2.Lökotoksinler

Lökotoksinler membran hasarı oluşturan toksinlerdir. İnsan hekimliğinde lökosidal toksin üreten stafilokal izolatların nekrotik deri lezyonları, frunkulozis ve osteomyelitis vakalarından izole edildiği bildirilmektedir (Couppie ve ark. 1994, Lina ve ark. 1999). Bunlardan en önemlisi Panton-Valentine Leukosidin (PVL) olarak bilinmektedir.

1. 5. 2. 2. 1. PVL Nedir: Bazı alfa hemolizinler diğer hücrelere ek olarak lökositleri de eritebilir, lökosidin ya da (PVL) olarak adlandırılır. Lökosidin üreten stafilokok kökenleri üretmeyenlere göre fagositoza daha dayanıklıdır. Diğer hemolizinler kromozom üzerinde kodlanmıştır ve çoğu *S. aureus* suşunda bulunur. PVL toksini ise alfa hemolizinin bir homologudur, mobil bir faj üzerinde kodlanır ve transfer edilebilir. Özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL pozitif *S. aureus* suşlarının hastanelerde yayılabildiğini, hatta hastane kaynaklı salgınlara neden olabildiğini göstermektedir. *S. aureus* izolatları arasında ortalama olarak %2–10 arasında PVL pozitifliği bildirilmektedir (Lina ve ark. 1999, Morgan 2008). Tüm dünyada PVL lokusu taşıyan toplumlarda kazanılmış MRSA izolatlarında daha yaygın olarak görülmektedir (Vandenesch ve ark. 2003). Bu nedenle tüm dünyadaki suşlarda PVL lokusu önemli moleküler bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Vandenesch ve ark. 2003). PVL toksin genleri evcil hayvanlardan izole edilen suşlarda da bulunmuştur (Rankin ve ark. 2005). PVL tavşanlarda deri içi enjekte edildiğinde deride nekroz oluşturduğu belirlenmiştir (Ward and Turner 1980, Cribier ve ark. 1992).

1. 5. 2. 2. 2. PVL'in Tarihçesi: *S. aureus*'un toksinlerinden birisi olan PVL'in tarihi 1894'de başlamaktadır. İlk olarak Sir Alexander Ogston ve Louis Pasteur insan irinli enfeksiyonlarından alınan materyalle fare ve tavşanlarda enfeksiyon oluşturmayı başarmışlardır (Ogston 1880, Pasteur 1880).

S. aureus toksinleri üzerine araştırma yapan bir grup araştırmacı yıllarca PVL araştırmalarının önderliğini yapmışlardır. Yeni araştırma tekniklerinin bulunması ile birlikte bu alandaki çalışmalar inişli çıkışlı da olsa devam etmiştir. İlk çalışmalar *S. aureus*'un lökositler üzerine olan etkisine, sonraki yüzyılda yapılan çalışmalar ise lökosidinin genetik özellikleri üzerine odaklanmıştır.

PVL pozitif metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının salgınlara sebep olması üzerine PVL üzerine olan ilgi artmış ve son yıllarda tüm dünyada halk sağlığı ile ilgili bir sorun olarak ortaya çıkmış ve 1995 yılından bu yana PVL araştırmalarının sayısı gün geçtikçe artmıştır (Lina ve ark. 2010). PVL' in tarihinin incelenmesinde en önemli olaylar aşağıda tarih sırası ile verilmiştir:

1894. Van de Velde bazı *S. aureus* suşlarının lökositler üzerine toksik etkisi bulunması üzerine "lökosidin" terimini ilk kez kullanmıştır:

Stafilokokal l kosidin üzerine ilk araştırma Belçika'da Louvain Üniversitesi Patoloji ve Deneysel Tıp Bölümü'nde alışan Dr. Honor  Van de Velde tarafından yapılmıştır. 1894 yılında Van de Velde *S. aureus*'un virulens determinatları ve lökositlerin potansiyel koruyucu etkileri üzerine çalışmış; 1894 ve 1895 yılında bu araştırmaların çoğu yayımlanmıştır (Van de Velde 1894, Denys ve Van de Velde 1895). Van de Velde, *S. aureus*'un virulens özelliklerini inceleyebilmek için köpek ve tavşanlarda pleural infeksiyon modeli geliştirmiştir. Tavşanlarda, lokal *S. aureus* enjeksiyonundan bir-iki saat sonra pleura boşluğuna lökositlerin ulaştığını görmüştür. Enjekte ettiği ilk izolatlarda pleural boşlukta lökosit sayısı zamanla artmakla birlikte, görünümlerinin normal olduğu, tersine, pleural boşluğa verilen başka yeni bir izolatin lökositleri öldürdüğünü belirledi. Van de Velde yayınında lökositler " ld " ifadesini kullanmış ve durumu şöyle açıklamıştır: Bunun için "*Hücreler yuvarlak şekilli idi, çekirdek yoğundu ve sitoplazma açıkça g r niyordu, granül ve pseudopod yoktu; sonra sitoplazma belirginsizleşti. Lökositler incelendiğinde hepsinin hareketsiz olduğu ve diapedezis bulunmadığı görüldü*".

Bu lökosidal aktivite pleural boşluktaki bakteri sayısının 1000 kat, hayvan ölümlerinin 20 kat artması ile ilgiliydi. Van de Velde lökosidal aktivitesi bulunan bakterilerin kolaylıkla lökositleri öldürdüğü sonucuna vardı. Araştırmacı daha sonra *S. aureus* ile birlikte lökositleri birlikte kültüre ettiğinde, 37 C'de ilk üretildiğinde inkübasyonun başlangıcından 2 saat gibi kısa bir süre sonra lökositler ortama eklendiğinde lökosidal aktivitesi bulunan tek bir izolatin üreyebildiğini, tersine lökosidal aktivitesi bulunmayan izolatlarda 24 saat içerisinde tahrip olduğunu gördü. Bununla birlikte, lökotoksik izolat nedeni ile plural infeksiyonu bulunan hayvanlardan pleural sıvı alındığında ve bu lökotoksik olmayan *S. aureus* ve lökositlerle birlikte üretildiğinde bu bakterinin lökotoksik bakteriler gibi kuvvetli bir şekilde üreyebildiğini gördü. Bu nedenle, Van de Velde "*beyaz kan hücreleri birçok bakteriyi*

*öldürebilir ve onların harap olması bakteriyel üremeyi arttırmaktadır. Bu da hayvanlarda yüksek düzeyde ölüme sebep olan bakteriyel lökotosisiteyi açıklamaktadır” görüşünü ortaya attı. Van de Velde “lökotoksik izolatların lökositleri tahrip edebilen bir zehir ürettikleri” ve bu zehrin 58°C’de 10 dakikada ısıtmakla inaktive olmakla birlikte albuminoid (protein) yapıda molekül olduğunu bildirdi. Bu zehrin “lökosidal madde” veya “lökosidin” olarak isimlendirilmesini önerdi. Lökosidinin salgılanan bir madde olduğundan şüphelendi, çünkü santrifüjden sonra stafilokokal süpernatant hala beyaz kan hücreleri için oldukça toksikti. Ne yazık ki, hazırladığı preparatın bu bakterileri içerip içermediğini açıklayamadı. Van de Velde toksin üreten *S. aureus*’ un yalnızca hayvan vücudunda değil aynı zamanda in vitro ortamda kan, serum ve sıvı kültürde de üretilebildiğini gösterdi. Besi yerinde üremeden 48 saat sonra lökosidini saptadı ve “*S. aureus*’un virulensi lökositlerin etkisini ortadan kaldıran bir zehir üretebilme yetenekleri ile ilgilidir. Lökosidin üretimi stafilokoklar bol miktarda bulunduğu görülmektedir” dedi.*

1894. Van de Velde köpek lökositlerinin dirençli olduğunu gösterdi

Van de Velde aynı zamanda izolatlarının köpekler üzerine olan etkisini de inceledi (Van de Velde 1894). Tavşan lökositlerinin aksine, köpek lökositleri lökosidine karşı oldukça dirençliydi. Beyaz kan hücrelerinin lökosidin duyarlılığının türe bağımlı olduğunu öne sürdü.

1895. Van de Velde tarafından lökosidin aşılmasında ilk girişim

Van de Velde lökotoksik *S. aureus*’ un sıvı kültürü ve ısı ile inaktive ettiği sıvı kültürün süpernatantını filtreden geçirip tavşanlara verdi (Denys ve Van de Velde 1895) ve sıvı kültür ile aşılama sonrasında kaşeksi ve deri infeksiyonları gördü. Van de Velde yaptığı deneyi şu şekilde anlattı:“Çok yüksek dozlar hariç (100 kat), aşı hazırlamak için lökotoksik *S. aureus* izolatları kullanılan ve pleura içi enjeksiyonu yapılan hayvanların hiç birisi ölmedi. Aşılanan hayvanların pleural boşluklarından elde edilen lökositler oldukça normaldi. Bununla birlikte, sedimentasyon yolu ile pleural boşluktan ayrıldıklarında lökosidin ile muamele edildiklerinde tahrip oldular. Normal tavşandan serum ilavesi koruyucu etki meydana getirmedi. Tersine, aşıtlı tavşanlardan lökosidin ve serum karışımı ile aşılandıklarında lökositler tamamen normaldi.”

tespitini yaptı. Bunun üzerine, Van de Velde " *bu anti lökosidin özelliği inaktif kompleks oluşturarak muhtemelen lökosidini inaktive ettiği*" görüşünü öne sürdü.

1901. Neisser ve Wechsberg lökosidinin salgılanan bir toksin olduğunu açıkça gösterdi

1901 yılında, M. Neisser and Wechsberg lökotoksik *S. aureus* steril filtratının beyaz kan hücreleri için toksik olduğunu gösterdi (Neisser ve Wechsberg 1901). Bu araştırmacılar ilk olarak stafilokokal süpernatantın lökotoksik aktivitesini, yalnızca mikroskobik olarak değil, aynı zamanda kısmen aerobik koşullarda şekillenen metilen mavisi redüksiyonu ile de polimorf nükleer lökosit respiratorik aktivitesini ölçmüşlerdir.

1922. Julienne lökotosik ve hemolitik aktiviteleri birbirinden ayırdı

Stafilokokların kısa bir süre sonra yalnızca lökositler için değil eritrositler gibi diğer hücreler için de toksik oldukları görüldü (eritrositler için "*hematotoksin*" ve deri hücreleri için "*dermatotoksin*" veya "*nekrotoksin*" olarak isimlendirildi). Van de Velde'nin yayınlarında, lökotoksik ve hemolitik aktiviteler arasında belirgin bir ayrım yoktu. Van de Velde lökotoksik *S. aureus* izolatını taze tavşan ve köpek kanı ile inkübe ettiği zaman "*kanın iyice koyulaştığını ve sonunda kırmızı kan hücrelerinin kaybolduğunu*" bildirmişti. Bununla birlikte araştırmacı, bu durumu hemolize değil, bakterilerin oksijen kullanımına bağlamıştı. İkinci yayınında kırmızı kan hücrelerinin lökosidin tarafından hasara uğratıldığını bildirmişti. Bunu "*kırmızı kan hücreleri şişti ve eridi*" şeklinde ifade etmişti. Sonuç olarak, çalışmalar bu stafilokokal ekstrasellüler maddenin lökositler üzerine olan spesifik ve nonspesifik etkileri üzerine odaklandı (Neisser ve Wechsberg 1901). Daha sonraları, bazı stafilokokal hemolizinlerin lökosit membranının fonksiyon ve yapısını bozabildiği ortaya çıkarılmıştır. Hemotoksin ve nekrotoksin ile hayvan ölümü arasında ilişki saptanmıştır (Parker Weld ve Gunther 1931). Eskiden, stafilokokal hemolizinlerin lökosidik özellikleri gerçek stafilokokal lökosidininin özelliklerini gizlediğinden, Neisser-Weschberg lökosidini gibi, lökosidin olarak isimlendirilen maddeler, hemolizinler olarak bilinmekteydi (Wright 1936).

1922'de Philadelphia General Hospital'da görevli Louis A. Juliennelle lökosidal ve hemolitik aktiviteleri birbirinden ayırdı (Julienne 1922). Araştırmacı sıvı besi yerinde üreyen dört *S. aureus* suşunun biyolojik özelliklerini incelediğinde, onların lökotoksitesini yansıtan kobay lökositleri tarafından metilen mavisini indirme reaksiyonunu yalnızca iki suşun

süpernatantının neden olduğunu buldu. Bu suşlardan bir tanesi hemolizin üretmiyordu ve en fazla hemolizin üreten üçüncü suş lökositin üretmiyordu. Bu durum “*hemolitik ve lökositik aktivitelerin birbirine bağımlı olmadığını*” gösterdi.

1932. Panton ve Valentine lökositinin hemolitik aktivite ile ilgili olmadığını ve ciddi infeksiyonlara neden olan suşlar tarafından üretildiğini doğruladı

On yıl sonra, Londra Hastanesi Hale Klinik Laboratuvarı’nda çalışan Philip Panton ve Francis Valentine, ciddi ve hafif seyirli insan infeksiyonlarından izole ettikleri 22 *S. aureus* suşunun toksik özelliklerini karşılaştırdılar (Panton ve Valentine 1932). Hemolitik aktivite tavşan eritrositlerinde, lökotosisite insan lökositlerinde, nekroz tavşanlara intradermal enjeksiyon yolu ile, letalite genç tavşanlara damar içi enjeksiyon yolu ile incelendi. Araştırmacılar hemolitik ve lökotosik aktiviteler arasında karşılıklı bir ilişki gözlemediler, bu da lökositinin hemolizinden kesin olarak ayrı olduğunu gösterdi. 22 izolattan 7 tanesi yüksek lökositin ve zayıf hemolizin aktivitesine sahipti, bu da inceledikleri suşların yaklaşık %30’unun gerçek lökositin ürettiğini gösterdi. Üstelik araştırmacılar toksin üretimini insan infeksiyonları ile karşılıklı olarak incelediklerinde “*kuvvetli lökositin ve zayıf hemolizin aktivitesine sahip olan suşların sıklıkla akut ciddi infeksiyonlardan izole edildiklerini ve tersine zayıf lökositin ve kuvvetli hemolizin aktivitesine sahip olan suşların kronik seyirli yüzeysel infeksiyonlardan izole edildiğini*” bildirdiler. Bu ciddi infeksiyonlar piyemi veya amfizem ile seyreden dört deri ve iki kemikten izole edilen suşlardan oluşuyordu. Böylece, araştırmacılar genellikle ciddi *S. aureus* infeksiyonları ile ilgili gerçek lökositinin, hemolizin ile benzer olmadığını gösterdiler.

1936. Valentine lökositin duyarlılığını tanımladı ve insan infeksiyonları esnasında artan serum anti lökositin antikor titrelerini gösterdi

1936’da, ikinci bir yayında Valentine (Valentine 1936), gerçek lökositinin, lenfosit veya eritrositleri etkilemeksizin, hem insan hem de tavşan kanındaki tüm fagositik lökositleri tahrip ettiğini ve alfa hemolizinin tavşan eritrositleri ve beyaz kan hücreleri için toksik olduğunu gösterdi. Üstelik alfa hemolizin tarafından tahrip edilen tavşan lökositlerinin genellikle gerçek lökositinler tarafından tahrip edilen insan veya tavşan hücrelerinden farklı görüldüğünü bildirdi. Araştırmasında şu ifadeyi kullandı: “*Alfa hemolizinle muamele edilen tavşan nötrofilleri daha az dayanıklı bulunurken; nükleus parçalanmış fakat granüller*

hücrenin bir bölümünde kümelenmiş olarak görünmekteydi. Tersine, gerçek lökosidin ile muamele edilen hücreler küresel bir şekil almışlar ve granüller esas olarak periferde toplanmış; fazla toksin bulunduğu, hücreler patlıyor ve granüller serbest bırakılıyor.” Bu spesifik görünüm diğer araştırmacılar tarafından da doğrulandı (Proom 1937). Klinik gözlemler devam ederken, Valentine “*önemli miktarda lökosidin üreten sağlıklı hastalardaki gerçek doku invazyonları oluşmuş olan lezyonlardan izole edilen suşlar neredeyse lökosidinin önemli bir kısmını üretmekte*” olduğunu fark etti ve aynı zamanda kronik yüzeysel ve derin stafilokokal infeksiyonlarda serum anti-lökosidin aktivitesinde önemli bir artış buldu (Valentine 1936).

1936. Wright “Panton Valentine Lökositin” terimini ilk kez kullandı

1936 yılında, bu “gerçek” stafilokokal lökosidin, bunu lökotoksik aktivite ile diğer stafilokokal ürünlerden ilk kez ayıran J. Wright (Wright 1936) tarafından, “Panton Valentine Lökositin” (PVL) olarak isimlendirildi.

1957. PVL irinli infeksiyonlarda saptandı

Oxford Üniversitesi Patoloji Bölümü’nden Sir William Dunn ve ark. tarafından yapılan daha sonraki araştırmalar, PVL’in stafilokokal alfa ve delta hemolizinlerin lökotoksik aktivite de dahil olmak üzere çoklu sitotoksik aktiviteye sahip olduklarını, granülositler ve makrofajlar üzerine selektif etkili olduklarını doğruladı (Gladstone ve van Heyningen 1957). Bu araştırmacılar, PVL üretmek için hala kullanılan bir yöntem olan kültür tüpleri kullanarak modifiye CCY besi yerinde üreyen bakteriden önemli miktarda PVL üretmeyi başardılar. Onlar aynı zamanda PVL üretimini, PVL antiserumunun nötralize edici etkileri ve kültür süpernatantının incelenmesiyle elde edilen stafilokokal koagulaz pozitif klinik izolatlarında araştırmışlar, PVL üreten irinli infeksiyonlardan izole edilen 61 izolattan 31 tanesi, 10 nazal kolonizasyon izolatından iki tanesi ile karşılaştırmışlardır. KNS suşlarının PVL üretmediği ancak, *S. aureus*’un PVL üretiminin fazla olduğunu gördüğünü bildirmişlerdir.

1959. PVL’nin saflaştırılması ve iki komponentinin özellikleri

1959 yılında, aynı üniversiteden Woodin, ilk kez CCY besi yerinde PVL’nin özelliklerini belirleyebilmek için lökosidal testler ve immunoloji ile modern kimya

çalışmalarını birlikte yaptı (Woodin 1959). Amonyum sülfat ve hydroxylapatite ile süpernatantın fraksiyonları PVL' yi kısmen saflaştırabildi ve PVL' nin 'hızlı' (F: Fast) ve 'yavaş' (S: Slow) fraksiyonlar olarak isimlendirilen iki komponentten oluştuğunu bildirdi. Woodin saflaştırılmış F ve S parçalarının immunolojik olarak tek bir madde gibi davrandıklarını doğruladı (Woodin 1960). Woodin PVL'nin saflaştırılmış parçalarını kullanarak PVL-lökosit etkileşimi üzerine birçok bilgi topladı. Bu titiz çalışmasının verilerini aynı zamanda makalesinde de özetlemiştir (Woodin 1972).

1962. Hastalarda anti PVL antikorlarının saptanması ve bir antitoksin lökosidin geliştirilmesi

Gladstone ve ark. saflaştırılmış PVL komponentlerini kullanarak infekte bireylerde anti-PVL serum titrelerini değerlendirmişler ve inceledikleri 121 klinik infeksiyon bulunmayan kişide anti-F ve anti-S titreleri buna karşılık gelen anti-alfa hemolizin titrelerinden oldukça değişken olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar, osteomyelitis, furunkulosis veya kronik apseli 19 hastada anti-F ve anti-S titreleri normal değerlerin 6-7 katı daha fazlaydı. Ne yazık ki araştırmacılar izolatların PVL üretilip üretilmediğini kontrol etmemişlerdi (Gladstone ve ark. 1962). Gladstone ise daha sonradan her bir purifiye komponenti formol ile inaktive ederek toksoid bir lökosidin geliştirmiştir. Lökosidin toksoid tek bir deri içi enjeksiyon sonrasında sağlıklı kişilerde oluşan spesifik antikorlar hakkında bilgi edinilmesini sağlamıştır. Bu lökosidin toksoid kronik stafilkokal osteomyelitis ve yumuşak doku infeksiyonları bulunan hastalarda tedavi edici amaçla uygulanmıştır. Anti-F ve anti-S lökosidin antikor titrelerinde iki hafta içinde oldukça önemli bir artış görülmüş ve titreler 4-5 hafta yüksek kalmıştır. Bunun üzerine araştırmacılar "*kronik suppuratif lezyonlu hastalarda bile PVL'ye karşı optimal immun yanıt oluşmadı ve artan yanıt uygun inokülasyonlarla olabilir*" yorumunu yapmışlardır. Bununla birlikte, toksoid preparat genellikle enjeksiyon yerinde lokal yangı (sertlik, eritem ve acı) ve sıklıkla kısa süreli kırgınlık, vücut ısısında az miktarda yükselme gibi orta düzeyde sistemik belirtiler görülmesine sebep oldu.

1972. Genetik çağ: PVL kodlayan fajların identifikasyonu ve PVL genlerinin karakterizasyonu

1972' de, Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Antimikrobiyal Tedavi Bölümü'nden Van der Vijver ve ark. (Hollanda) bir grup A fajı tarafından *S. aureus*'da lökosidin üretiminde

bir artışa neden olan lizojenik konversiyon olayını bildirdiler. Bununla birlikte, kullandıkları test sisteminde tam bir lükosidin belirlemeyi başaramadılar (Van der Vijver ve ark. 1972). Kamio ve ark. (Tohoku University, Sendai, Japonya) sonunda PVL genlerinin *phiPVL* ve *phiSLT* olarak isimlendirilen iki faj tarafından taşındığını doğruladı (Kaneko ve ark. 1998, Narita ve ark. 2001). Aynı grup, bununla birlikte lükosidin bildirilen genler tarafından kodlanan F ve S komponentlerini de tanımladı (Rahman ve ark. 1991, Rahman ve ark. 1992). Gilles Prévost ve ark. (Tıp Fakültesi Bakteriyoloji Enstitüsü, Fransa) Kamio ve ark. tarafından bildirilen PVL genlerinin, PVL genleri (*luk-PV*) olarak tarif edilen bir gamma hemolizin geninin başka bir şekli olduğunu göstermişlerdir ve durumu şöyle anlatmışlardır (Prevost ve ark. 1995b): “PVL genleri birbirleri ile sinerjik olarak çalışan *lukS-PV* ve *lukF-PV* olmak üzere iki protein komponentinden oluşmaktadır.”

1995. Klinik *S. aureus* izolatlarında PVL genlerinin dağılımı

Prévost ve ark. insan izolatlarında PVL üretimi sıklığını belirleyebilmek için saflaştırılmış PVL komponentlerine karşı yüksek titreli tavşan antikoru kullanarak immunopresipitasyon yapmışlardır (Prevost ve ark. 1995a). 309 *S. aureus* izolatından 2 trakeal sıvı ve 3’ü çok ciddi deri lezyonlarından izole edilmiş olan olmak üzere, 5 tanesinin PVL ürettiğini belirlemişlerdir. Deri infeksiyonları, septisemi ve asemptomatik nazal taşıyıcı hastalar arasında PVL üreten suşların dağılımını incelediklerinde ise PVL üretiminin deri infeksiyonu bulunan özellikle aseptik furunkulozisli hastalarda daha yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir (Prevost ve ark. 1995a). Yves Piémont, ciddi deri lezyonu bulunan Fransız hastalardan düzenli olarak izole ettiği *S. aureus* suşlarının toksinlerinin saptanması üzerine çalışmıştır. Araştırmacı PVL-üreten suşlar ile frunkuloz arasında kuvvetli; tersine, immunsupressif çocuklarda hızlı gelişen fütal stafilokokal infeksiyonlarda zayıf bir bağlantı olduğunu belirlemiştir. Araştırma sonucunda fütal sonucun genellikle lökopeni ve hemoptisis ile ilişkili daha önce seyreden basit influenza benzeri bir sendromdan kaynaklandığı görülmüştür. Piémont, Jerome Etienne (Stafilokokal Hastalıklar Ulusal Merkezi Başkanı, Lyon) ile temasa geçmiş ve bu sonuçları doğrulamak için onların PVL kolleksiyonunun incelenmesini istemiştir. Bu araştırmanın ilk sonuçları, *luk-PV* için 172 *S. aureus* izolatını PCR ile 1999 yılında inceleyen Lina ve ark. tarafından yayımlanmıştır. Çalışmada, PVL pozitif *S. aureus* suşları ile furunkulozis ve aynı zamanda 23 vakadan 14 tanesinin ölüm ile sonuçlandığı toplumda kazanılmış pnömoni arasında kuvvetli bir bağlantı bulunduğunu bildirmiştir (Lina ve ark. 1999).

2002. PVL pozitif *S. aureus* izolatları ile ilgili nekrotize pnömonilerin tanımlanması ve toplum kökenli *S. aureus* izolatlarında PVL genlerinin saptanması

PVL pozitif *S. aureus* suşları ile ilgili pnömoni, PVL negatif *S. aureus* pnömonileri ile karşılaştırılarak, 2002 yılında Gillet ve ark. tarafından incelenmiştir (Gillet ve ark. 2002). PVL-üreten *S. aureus* suşları genellikle sağlıklı çocuk ve genç hastalarda hemoptisis ve lökopeni ile karakterize hızlı bir şekilde akut solunum stresine yol açan hemorajik, nekrotize pnömoniyeye neden olmaktadır. Genellikle öncelikle influenza benzeri bir sendromdan sonra, kurbanlarının dörtte üçünün öldüğünü bildirilmektedir. Otopside bilateral pulmoner hemoraji ve nekroz görülmekteydi. Dünyanın pek çok yerinden de benzer vakalar bildirilmişti. 2002’de Dufour ve ark. toplumda kazanılmış MRSA infeksiyonu bulunan Fransız hastalarda PVL genlerini saptamıştır (Dufour ve ark. 2002). 2003 yılında Vandenesch ve ark. MRSA klonlarını Avrupa, Kuzey Amerika ve Okyanusya’da bildirmiştir (Vandenesch ve ark. 2003). Bu araştırma PVL genlerinin epidemik klonlar halinde toplumda sürekli dolaştığını ortaya koyarken bu tahrip edici toksinin diğer özelliklerinin araştırılması üzerine bilim adamlarının odaklanmasına sebep olmuştur.

1. 5. 2. 3. 3. Etki Mekanizması: 1932 yılında Panton ve Valentine birbirleri ile sinerjik olarak çalışan, moleküler ağırlıkları 32 ve 38 kDa olan, *LukS-PV* ve *LukF-PV* olmak üzere iki protein komponentinden oluşan Panton-Valentine Leukocidin (PVL) tanımlamışlar (Prevost ve ark.1995b) ve bu lökosidinin insan ve tavşan polimorf nükleer hücreler, monositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi bulunan önemli bir virulens faktörü olduğunu bildirmişlerdir (Cribier ve ark. 1992, Siqueira ve ark. 1997). Birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (hızlı) ve S (yavaş) adında iki protein komponentinden oluşmuş bu ekzotoksin; konak lökositlerinin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olmaktadır (Prevost ve ark. 1995b). Her biri iyi antijen yapısında olup, her birinden ayrı toksoid oluşturulur. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin her ikisi de gereklidir. Toksin, hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökosidin üreten stafilokoklar hücre içerisinde üremeye devam ederler. Bu iki protein komponenti birlikte etki ettiğinden ve doğrudan hücre zarı üzerine etkili olduklarından bu toksin “synergohymenotropic toksin” olarak da adlandırılmaktadır (Supersac ve ark. 1993). Bu toksinin immunsupressif genç hastalarda furunkulozis ve nekrotik

hemorajik pnömoni ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Gillet ve ark. 2002). Bu toksini bulunduran türlerin infeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekrotizan pnömoni tablosu görülmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Peacock 2005, Moreillon 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 2. 3. 4. Klinik Etkileri: PVL lökosit tahribi ve nekrotizan pnömoniyeye sebep olarak ciddi vakalarda 72 saat içerisinde hastanın ölümüne neden olmaktadır (Anonim 1). Diğer stafilokokal nekrotizan pnömoni vakaları ile karşılaştırıldığında toplumda kazanılmış pnömoni vakalarının %85'i'nin PVL pozitif suşlardan oluştuğu bildirilmektedir. Toplumda kazanılmış pnömoni vakalarından etkilenen genç ve sağlıklı hastalar kısa sürede kötüleşmekte ve %40'ından fazlasında ölüm görülmektedir (Bradley 2006). PVL üreten *S. aureus* suşları pek çok öldürücü bakteriyel infeksiyon salgınında önemli rol oynar (Havkes N, 2006). PVL stafilokokal protein A sentezini arttırarak yangıya sebep olan pnömoni için önemli bir proinflatuvar faktör olarak etki göstermektedir (Anonim 2).

1. 5. 2. 3. 5. Epidemiyoloji: PVL *S. aureus* infeksiyonları ile ilgili pek çok toksinden birisidir. PVL, özellikle Toplum Kökenli-Metisilin Dirençli *S. aureus* (TK MRSA)'a bağlı toplum kökenli cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ile akut nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan önemli bir virulans faktörüdür (Moreillon 2005). PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte, hatta akut nekrotizan pnömonilerde olduğu gibi ölümle sonuçlanabilmektedir.

Yapılan çalışmalarda büyük bir kısmında PVL pozitif TK MRSA suşlarının çoğunun SCCmec tip IV veya Tip V taşıdıklarını ortaya konulmuştur (Tristan ve ark. 2007). PVL *S. aureus*-spesifik bir ekzotoksindir (Gravet ve ark. 1998). PVL özellikle frunkulozis gibi deri lezyonları ile ciddi nekrotize pnömoni vakalarında bildirilmektedir. 1986-1998 yılları arasında Fransa'da yapılan bir çalışmada PVL'in klinik önemi gösterilmiştir. Çalışmada, PVL pozitif 8 toplum kökenli pnömoni vakasından 6 tanesinin ölüm ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Gillet ve ark. 2002). Tersine bazı çalışmalarda da PVL'nin yalnızca pnömoni ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olmadığı da bildirilmektedir. Voyich ve ark. deneysel olarak infekte ettikleri farelerde PVL negatif ve PVL pozitif TK MRSA suşlarının eşit düzeyde virulent olduklarını bildirmişlerdir (Voyich ve ark. 2006). Son çalışmalar, diğer virulens genleri ile birlikte PVL'nin TK MRSA suşlarının virulensine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Karahan ve ark. 2008, Lina ve ark. 2010).

Toplum kökenli MRSA: İlk kez 1998'de ABD'de (Herold ve ark. 1998), ardından Avustralya'da yerli toplumunda (Turnridge ve Bell 2000) daha önce bilinen risk faktörleri ve hastanede yatış öyküsü bulunmayan çocuklarda MRSA infeksiyonlarını bildirilmiştir. Bu izolatlar TK MRSA olarak adlandırılmaktadır. 2002 yılından itibaren toplum kökenli izolatların tüm dünyada büyüyen bir problem olarak karşımıza çıktığı bildirilmektedir. Toplum kökenli MRSA en sık nekrotik apselerle seyreden deri ve yumuşak doku infeksiyonları oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra nekrotizan pnömoni gibi yaşamı tehdit edici infeksiyonlar da yapabilmektedir. Benzer klinik bulgular oluşturan metisilin duyarlı stafilokok (MSS) izolatlarında olduğu gibi, nekrotizan infeksiyonlar yapan toplum kökenli MRSA suşlarında da sıklıkla, faj Sa2 üzerinde taşınan *lukS* ve *lukF* genlerince kodlanan PVL toksini bulunmaktadır.

PVL'nin TK MRSA infeksiyonlarındaki rolü tam açıklanamamakla birlikte arada güçlü bir epidemiyolojik ilişki bulunmaktadır. Toplum kökenli MRSA izolatlarının bir diğer özelliği de hemen çoğu zaman SCC*mec* tip IV taşımalarıdır. Bu suşların toplumda yaygın olarak bulunan ve PVL taşıyan metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarına (ör. ST30 gibi) SCC*mec* tip IV girmesi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Diğer hipotezler ve olası yollar arasında; hastane kökenli izolatların PVL sentez genleri kazanıp toplumda yayılımı (ör. toplum kökenli MRSA ST22 gibi) veya toplumda bulunan MSSA suşlarının hem faj F Sa2 hem de SCC*mec* tip IV kazanması (ör. ST1, ST59, ST80, ST159 klonal soylarındaki toplum kökenli MRSA suşları gibi) bulunmaktadır. Toplum kökenli MRSA ST8 ayrıca *arc* gen kümesi yanı sıra arjinin dekompozisyonunu sağlayan ikinci bir gen kümesi (ACME) daha kazanmış olmaları ile karakterizedir.

Çoklu dirençli *S. aureus* suşlarının 1950'li yıllardaki en önemli temsilcisi 80/81 (faj tipi) olarak adlandırılan izolatlardır. Bu izolatlar günümüzde kullanılan Multilokus Sequence Tipleme (MLST) ile ST30 klonunda yer almaktadır. Bu izolatların bir kısmının PVL ürettiği de gösterilmiştir. 80/81 klonu hastaneler ve toplumda yayılmış ve özellikle deri ve derin yumuşak doku infeksiyonlarına yol açmıştır. *S. aureus* 80/81 1950'lerde tüm dünyaya yayılmıştır. 1959 yılında metisilin tedavisi girmesi ile bu klonun izolasyon sıklığında düşme olmuştur, fakat son yıllarda 80/81 klonu özellikle Avrupa ülkelerinde toplum kökenli MRSA olarak tekrar karşımıza çıkmıştır (Robinson ve ark. 2005)

Bölümümüzde yapılan çalışmada 2002-2006 yılları arasında izole edilen *S. aureus* suşlarında PFGE ve varyantları ile birlikte 3 pulsotipin varlığı belirlenmiştir. Pulsotip B

suşları SCCmec tiplendirmesi ile tip IV, MLST ile ST8 (USA 300 olarak bilinen ABD’de toplum kökenli izolatlar arasında en yaygın olarak görülenlerden bir tanesi) *spa* ile t190; pulstip A ve C suşlarının ise SCCmec tip III, *spa* tiplendirmesi ile t030 ve MLST ile ST 239 ve ST 239 benzeri bir klon olduğu belirlenmiştir (Türkyılmaz ve ark 2010). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde yapılan bir çalışmada 2004-2005 yıllarında hastanedeki dominant *S. aureus* suşunun SCCmec tip III taşıdığı ve bu suşların Brezilya klonu olarak bilinen ST239 klonunun bir üyesi olduğu saptanmıştır (Gülay 2008). ST 239 Brezilya klonu olarak bilinir ve önemli hastane kökenli klonlardan birisidir (Deurenberg ve ark. 2007).

ABD’de toplum kökenli izolatlar arasında iki klonal soy çok yaygındır. Bunlar ST1 (USA400) ve ST8 (USA 300) olarak adlandırılmaktadır. Bazı bölgelerde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından en sık bu suşlar izole edilmektedir (Seybold ve ark. 2006). Hastane kökenli MRSA’da olduğu gibi bazı toplum kökenli izolatlar da ülkeler ve kıtalar arasında yayılabilmektedir. Örneğin, toplum kökenli ST8 suşunun birçok Avrupa ülkesinde yayıldığı makrolid direnç genleri *msrA-mph* taşıyan ST8 (USA 300) klonun da Avrupa ülkelerinde görülmeye başlandığı bildirilmektedir (Witte ve ark. 2007). Avrupa’da 2004 yılında yapılmış bir çalışmada, risk faktörü olmayan bireylerde toplum kökenli MRSA prevalansının % 0,03-1,5 arasında değiştiği gösterilmiştir (Tiemersma ve ark. 2004).

PVL üzerine yapılan çalışmalar 1894 yılında başlamış ve hala devam etmektedir. PVL’nin *S. aureus* infeksiyonlarının patogenezisindeki rolü hala tam olarak aydınlatılamamıştır. PVL ile ilgili *S. aureus* infeksiyonlarının insidensi yıldan yıla artmaya devam etmektedir ve tüm dünyada PVL genlerinin yayılmasını toplumda kazanılmış MRSA suşları sağlamaktadır. Çalışmalar tedavi ve korunma ön planda olmak üzere “anti-toksin” ve “toksoid” kavramları üzerine devam etmektedir (Lina ve ark. 2010).

1. 5. 2. 3. Eksfoliyatif Toksin

Epidermolitik bir toksindir. Stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Eksfoliyatif toksin A; ısıya duyarlı ve plazmid orjinlidir, eksfoliyatif toksin B ise ısıya dirençli ve yapısal geni kromozomaldır. Bu iki protein yapısal olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Stafilokoksik soyulmuş deri sendromunun etkeni eksfoliyatif toksin (eksfoliyatif toksin, epidermolitik toksin) salgılayan *S. aureus*’tur (Moreillon ve ark.

2005, Alen ve ark. 2006). Eksfoliatif toksin epidermisdeki stratum granulosum tabakasını oluşturan hücrelerin intersellüler bağlarının kopmasına ve stratum granulosumun ayrılmasına neden olur. Toksinin sitolitik ve inflamatuvar etkisi yoktur. Bu nedenle soyulmuş deri lezyonlarında lökositler ve etken bakteriler bulunmaz (Tünger ve ark. 2005).

1. 5. 2. 4. Enterotoksin

Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksinin A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere sekiz immunolojik tipi vardır. Enterotoksin; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında süper antijen olarak davranır. *S. aureus* suşlarının % 35-50'inin bu toksinleri oluşturabildiği saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde sık karşılaşılan toksinlerdir (Moreillon ve ark. 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 2. 5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

TSST sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur. Süper antijen olarak davranır. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. *S. aureus* suşlarının %5-25'i TSST geni taşır. Son yıllarda KNS'lara bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir (Dinges ve ark. 2000, Moreillon ve ark. 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. Enzimler

1. 5. 3. 1. Katalaz: Tüm stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi (H₂O₂), toksik olmayan oksijen ve suya ayrıştıran bir enzimdir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanırlar (Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 2. Koagülaz: Stafilokoklar tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteinidir. İki tip koagülaz bulunur; serbest koagülaz ve bağlı (clumping factor) koagülazdır. Bu enzimlerin farklı mekanizmalarla plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir.

Koagülaz testi lam yöntemiyle bağlı, tüp yöntemiyle serbest koagülazın tayini için kullanılır. Lam koagülaz testi negatif olan stafilokoklar için mutlaka tüp koagülaz testi de

uygulanmalıdır. Koagülaz negatif türlerde var olan “clumping faktör” nedeniyle testin pozitif olabileceği de unutulmamalıdır. Koagülaz pozitif olan diğer stafilocoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi subsp.*’dir. Bugün *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagülaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Koagülaz pozitif stafilocokların (KPS) üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojeniteye katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 3. Lipaz: *S. aureus* suşlarının tümü ve KNS’ların yaklaşık % 30’undan fazlası lipaz enzimi üretir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilocokların yaşamasını sağlamakta ve yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonların gelişimine neden olmaktadır (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 4. Hiyaluronidaz: Konak bağ dokusu matriksinde asit mukopolisakaritlerden olan hiyaluronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar. Antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. *S. aureus* suşlarının % 90’dan fazlası hiyaluronidaz oluşturur (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

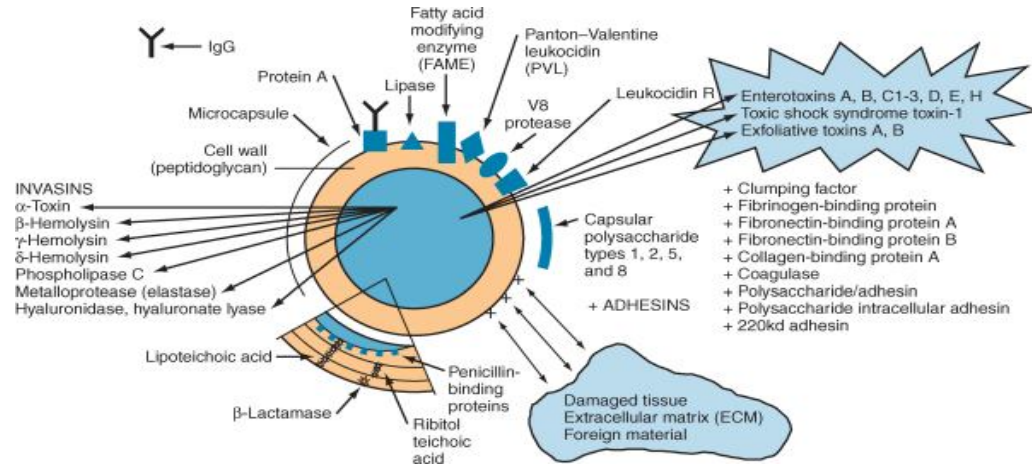
1. 5. 3. 5. Fibrinolizin (Stafilokinaz): Stafilocoklar tarafından ortama salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki ile fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur (Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 6. Fosfatidilinozitol – Spesifik Fosfolipaz C: Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir (Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 7. Deoksiribonükleaz (DNaz): DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3’-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *S. aureus* suşlarının % 90’dan fazlasında bulunur. Isıya dirençli bir enzimdir (Alen ve ark. 2006).

1. 5. 3. 8. Beta-laktamaz: Stafilokoklar salgıladıkları beta-laktamaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır (Bannerman 2003, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

S. aureus'un en önemli virulens faktörleri Şekil 1.'de ve *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinlerin özeti Çizelge 1. 3.'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1 *S. aureus*'un en önemli virulens faktörleri

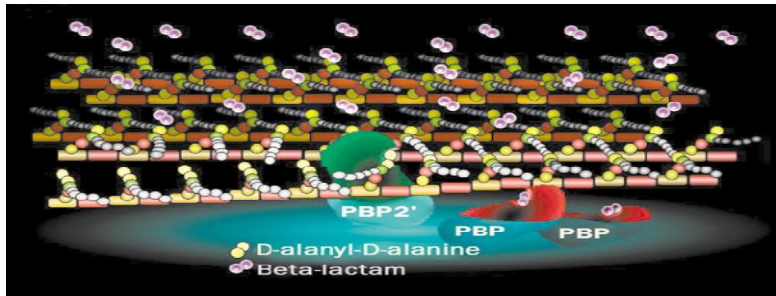
Çizelge 1. 3. *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler (Timbury ve ark. 2002)

Toksin	Etki
Hemoliziner (α , β , γ)	Sitolitik: çeşitli hayvan türlerinde eritrositlerin lizisi
Koagulaz	Plazmayı pıhtılaştırır. Laboratuvarlarda KPS ve KNS türlerinin ayırımında kullanılır
Fibrinolizin	Fibrinin sindirimi
Lökositin	Lökositlerin tahribi
Hiyaluronidaz	Hiyaluronik asidin parçalanması
DNA'az	DNA hidrolizi
Protein A	Lipolitik
Kapsül	Antifagositik
Epidermolitik toksin	Epidermal yayılma ve eksfoliatin
Enterotoksinler	Kusma ishale sebep olan gıda zehirlenmesi
Toksik Şok Sendrom Toksini	Şok, deri döküntüsü

1. 6. Antibiyotik Direncinin Özellikleri

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde başarısızlıklara neden olmaktadır. Direnç gelişiminde en önemli faktörler, antibiyotiklerin endikasyonları dışında yaygın bir şekilde, uygun olmayan doz ve sürelerde kullanımlarıdır. Bu ilaçların yetersiz doz ve sürede kullanılması, bakteri kolonizasyonunu arttırmakta ve dirençli suşların oluşumuna neden olmaktadır. Bir antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi, aynı sınıftan diğer ilaçlarda da bu soruna yol açmakta ve çoklu direnç problemine yol açmaktadır. Stafilokoklarda β -Laktam grubu antibiyotiklere direnç son yıllarda önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Broks ve ark. 2007, Hartman ve ark. 1984).

β -Laktamlara direnç, β -laktamaz enzimine bağlıdır. Bu ilaçların β -laktam halkası hidrolize edilir. Bu enzimin 200'den fazla türü bilinmektedir. Genel olarak penisilinaz ve sefalosporinazlar olarak ikiye ayrılır (Gür 2002). PBP, penisilin gibi β -laktam antibiyotiklerin hedefidir. β -laktam molekülü, yapısal analogu olduğu D-alanil-D-alanin bağlanma bölgelerinden stafilokokların PBP'lerine kovalent olarak bağlanır (Şekil 2). Bu da PBP'yi inaktive ederek peptidoglikan ağdan hücre rüptürüne sebep olup peptidoglikan sentezinin karşılıklı köprüler oluşturma aşamasını inhibe eder. Fakat, stafilokoklardan β -laktam grubuna direnç geliştirmiş bakteriler olan MRSA ve metisilin dirençli koagulaz negatif stafilokoklar (MRKNS) bu direnci çoğunlukla PBP2'(veya PBP2a) olarak dizayn edilmiş ve β -laktamlara bağlanma afinitesi çok düşük olan tek bir PBP sentezleyerek gerçekleştirirler (Hartman 1984).



Şekil 1.2. β -laktamların etki mekanizması: β -laktam, D-alanil-D-alanin residülerinin yapısal analogudur. *S. aureus*'un PBP'lerini inaktive eder, fakat PBP 2'ye yüksek afiniteyle bağlanamaz. Bu yüzden MRSA, β -laktamların varlığında peptidoglikan sentezine devam edebilir. Halbuki MSSA bunu yapamaz (Hiramatsu 2001).

Sonuç olarak PBP2', β -laktamların varlığında da peptidoglikan sentezini devam ettirebilir. Bu tek PBP2' geni, lateral gen transferi yoluyla şu anda bilinmeyen bir bakteriden *S. aureus*'un

aldığı, mobil bir genetik eleman tarafından taşınan ve *mecA* olarak adlandırılan ekzojen bir SCC*mec* geni tarafından kodlanır (Katayama ve ark. 2000).

Hastane kökenli *S. aureus* izolatlarının % 40-60'ı metisiline dirençlidir (Rice 2006, Borg ve ark. 2007). Bu oranlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde daha da yüksektir (Rosenthal ve ark. 2006). Hastane kökenli izolatlar dışında, son 6-7 yıldır, ağır nekrotik infeksiyonlar yapan toplum kökenli MRSA suşları da insan sağlığını tehdit etmektedir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, bütün bu türlerde gözlenen direnç artışının, direnç genlerinin toplumda sık olarak bulunan epidemik klonlarca alınmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Bu klonlar hastane ortamına girdiğinde de özellikle sağlık çalışanlarının elleriyle ortama ve hastadan hastaya yayılmaktadır (Witte ve ark. 2008).

İlk MRSA olguları metisilin kullanıma girmesinden iki yıl sonra 1961 yılında İngiltere'de bildirilmiştir. O zamandan günümüze MRSA klonları tüm dünyada, bu arada ülkemizde de yayılmıştır. Ülkemizden 11 laboratuvarın katıldığı ve Akdeniz ülkelerinde antibiyotik direncini izlemeyi hedefleyen ARMed çalışmasına göre kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında MRSA oranı 2003, 2004 ve 2005 yılları için sırası ile % 43, % 40 ve % 35'dir (Borg ve ark. 2007). Farklı laboratuvarlara göre oranlar % 21 ile % 70 arasında (ARMedraporu www.earss.rivm.nl) değişmekle birlikte, bu oran ARMed'e katılan ülkeler arasında en yükseğidir. SENTRY çalışmasında da ülkemiz için MRSA oranı % 30,9 olarak bildirilmiştir (Sader ve ark. 2005). MRSA izolatlarının prevalansı özellikle yoğun bakım ünitelerinde % 80'i geçmiştir (% 84) (Rosenthal ve ark. 2006). Dünyadaki oranlar da farklı değildir. SENTRY sürveys programında 1997-1999 yılları arasındaki MRSA prevalansının Avustralya için % 22,4, Japonya için % 66,8, Latin Amerika ülkeleri için % 34,9, ABD için % 32,4 ve Avrupa ülkeleri için % 26 olduğu görülmüştür (Diekema ve ark. 2001, Bell ve Turnidge 2002). Avrupa'da MRSA prevalansı ülkeler arasında değişmektedir. Kuzey Avrupa ülkeleri ve Hollanda'da prevalans % 1-2 iken, doğu ve güneye inildikçe prevalans artmaktadır (EARSS 2005).

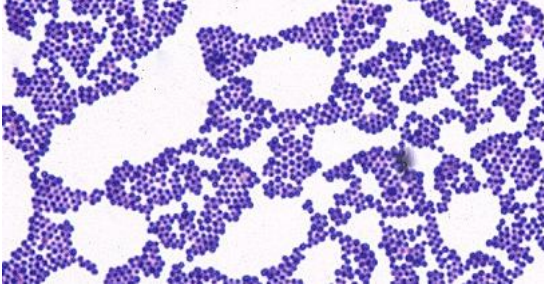
1. 7. *S. aureus*'ın Tanısında Kullanılan Laboratuvar Testleri

1. 7. 1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemler mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ortaya koyan biyotipik profilleri, antibiyotik duyarlılıkları, duyarlı oldukları faj tipleri ve protein içeriklerini inceler.

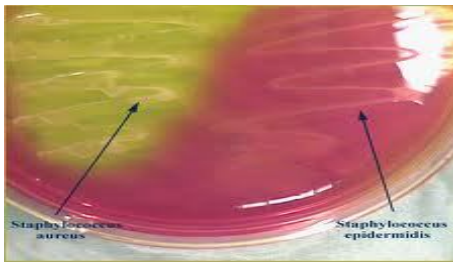
Fenotipik yöntemlerin; mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin değişebilir olması nedeniyle tahmin edilemez ve çevre koşullarının etkisinde olması, serotiplendirme ve faj tiplendirmesinde özgül reaktifler gerektirmesi, çok fazla işlem gerektirdiği için salgın araştırmalarında yavaş kalması ve tek nükleotitteki nokta mutasyonlarını saptayamamaktadır. Daha da önemlisi, fenotipik tiplendirme yöntemlerinin patojen ve apatojen ayırımında yetersiz kalmasıdır (www.klimik.org.tr/FileUpload/BJFkyris8SHd.pdf). Stafilocokların identifikasyonunda en sık kullanılan fenotipik yöntemler aşağıda özetlenmiştir:

1.7. 1. 1.Gram Boyama: Tipik olarak stafilocoklar, irin veya balgamin Gram boyanması ile pozitif koklar şeklinde görünmektedir.



Şekil 1.3. *S. aureus*'un mikroskopik görünümü

1.7. 1. 2. Kültür: Stafilocoklar konvansiyonel çoğu besiyerinde rahatlıkla üreyebilmektedirler. Tipik kolonilerin gözlenebilmesi için kanlı agar plaklarına örnekler ekilir ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilir. Fakat hemoliz ve pigment ürünleri ilk günler görülmeyebilir. *S. aureus* diğer stafilocokların fermente edemediği mannitolü fermente edebilmektedir.



Şekil 1.4. Mannitolü tuzlu besi yerinde üreyen *S. aureus* ve *S. epidermidis*

Farklı bir flora ile kontamine örnekler %7,5 NaCl içeren bir besiyerine ekimleri yapılarak *S.aureus* izole edilebilir. Tuz *S.aureus* hariç diğer organizmaların üremesini

engellemektedir. Mannitollü tuzlu agar veya ticari kromojenik besiyerleri, *S.aureus*'un nazal taşıyıcılığını belirlemede kullanılan besiyerleridir (Cengiz 1999, Brooks ve ark. 2007).

1. 7. 1. 3. Katalaz Testi: Sitokrom oksidaz enziminin varlığını tespit etmek için bu test kullanılmaktadır. Bir damla %3 hidrojen peroksit solüsyonu lam üzerine damlatılır ve bakteri kolonisi ile karıştırılır. Köpürme oluşumu (oksijenin serbest kalması) testin pozitif sonuç verdiğini göstermektedir (Cengiz 1999, Brooks ve ark. 2007).

1. 7. 1. 4. Koagülaz Testi: 1/5 oranında seyreltilmiş sitratlı tavşan veya insan plazması, et suyu kültürü veya agar üzerindeki kolonilerden eşit oranda alınarak karıştırılır ve 37°C'de inkübasyona bırakılır. Bir tüp, steril sıvı besiyeri plazma ile karıştırılarak kontrol amaçlı kullanılır. Eğer pıhtılar 1–4 saat içinde toplanırsa test pozitif olarak değerlendirilir. Koagülaz pozitif stafilokokların insanlar için patojen oldukları düşünülmektedir. Fakat köpek (*Staphylococcus intermedius*) ve yunuslardaki (*Staphylococcus delphini*) koagülaz pozitif koklar nadiren insanlarda hastalığa sebep olurlar (Cengiz A 2004).

1. 7. 1. 5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri: Klinik olarak önemli infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklar için broth mikrodilüsyon veya disk diffüzyon duyarlılık testleri rutin olarak yapılması önerilmektedir. β -laktamaz testi pozitif suslarda Penisilin G direncinden bahsetmek mümkündür. Yaklaşık olarak *S. aureus*'ların %90'ı β -laktamaz üretmektedir. Metisilin direnci diğer ilaçlara affinitesi olmayan penisilin bağlayan protein-2A (PBP-2A)'yı kodlayan *mec* geni ile ilişkilidir. Bu gen, PCR kullanılarak tespit edilebilir. Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması zor ve pahalıdır. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli fenotipik yöntemler daha sıklıkla kullanılmaktadır (Cengiz 1999, Brooks ve ark. 2007).

1. 7. 1. 6. Serolojik Testler: Organizmanın flora elemanı olarak bulunması nedeniyle *S.aureus* infeksiyonlarının tanısında serolojik testler çok az pratik değere sahiptir. Bununla birlikte antibiyotik duyarlılık paternleri, *S. aureus* infeksiyonlarının izlenmesine daha çok yardım etmektedir (Cengiz 1999, Brooks ve ark. 2007).

1. 7. 2. Genotipik Yöntemler

S. aureus hem insanlarda hem hayvanlarda oldukça yaygın olarak görülen önemli bir bakteriyel patojendir. *S. aureus* izolatlarının yeterli ve kesin olarak tiplendirilmesi lokal bir salgında izole edilen kökenlerin aynı ya da farklı olup olmadığının saptanması ve bir coğrafik bölgeden izole edilen kökenlerin dünyanın başka bölgelerinden izole edilenlerle karşılaştırılmasını sağlamaktır (Maslow ve ark. 1993).

Moleküler tiplendirme DNA bazlı tiplendirme yöntemlerini kullanarak, aynı tür içinde bulunan suşlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmaktır. Moleküler tiplendirme yöntemleri için mikrobiyal parmak izinin belirlenmesidir de denebilir. Moleküler tiplendirme yöntemlerinde aynı tür içindeki izolatların genetik olarak benzerlikleri araştırılmakta, izolatların aynı mı, farklı mı? sorularına yanıt aramaktır. Kimlerin nerede, ne zaman ve nasıl etkilendiğini araştırmaktır (Andrei 2006). Muhtemel kaynak, bulaş yolu ve vektörler belirlenmektedir. Moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak, izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişki belirlenebilmektedir. Moleküler tiplendirme teknikleri, epidemik hastalıklara neden olan *S. aureus* suşlarının yayılımını izlemek için kullanılmıştır. Bunlar arasında kromozomal DNA ekstraksiyonuna dayanan pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplifikasyona dayanan Stafilokokal Kromozomal Kaset *mec* (SCC*mec*) Analizi, sekansa dayalı yöntemlerden olan stafilokokal protein A (*spa*) dizi tiplendirme yöntemi ve MLST yüksek ayırım gücüne sahiptir ve en çok uygulanan yöntemlerdir (Andrei ve Zeruos 2006, Aanensen ve ark. 2005).

1. 7. 2. 1. İtilmiş Alan (Pulsed Field) Jel Elektrofrez (PFGE): PFGE, *S. aureus* ve diğer birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme metodudur. 1990 yılından beri PFGE, birçok bakteri için etkili ve çok yönlü genetik tiplendirme metodudur. PFGE temel olarak bozulmamış bakteri hücrelerinin yumuşak agaroz jele gömülmesini, daha sonra hücre duvarı lizisini ve kromozomun kesilmesini içermektedir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile genomun kesilmesinden sonra agaroz jel elektrofrez yöntemi ile ayırma işlemi gerçekleştirilir. Meydana gelen fragmentlerin konvansiyonel elektrofrez sistemlerle ayrılması çok zordur. PFGE sistemlerinde bu fragmentleri ayırmak mümkün olabilmektedir. Sistemlerde başlangıç vuruşları kısadır ve elektrofrez devam ettiği sürece artar. Bant

paternleri bir görüntüleme sistemi aracılığı ile değerlendirilir (Maslow ve ark. 1993, Tenover ve ark. 1994).

1. 7. 2. 2. Stafilokokal Kromozomal Kaset *mec* (SCC*mec*): Patojen bakterilerde virulansla ilişkili gen gruplarını taşıyan patojenite adacıkları tanımlanmıştır. Stafilokok cinsinde en iyi tanımlanan adacıkların başında, SCC*mec* olarak isimlendirilen stafilokokal kromozomal kaset gelmektedir. 2001 yılında, Ito ve arkadaşları, *mecA* geninin yerleştiği genom bölgesini tarayarak, *mecA* geninin mobil bir genetik adacık üzerinde yerleştiğini göstermişler ve bu yapıya SCC*mec* adını vermişlerdir (Ito ve ark 2001). SCC stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte; hiç virulans geni içermemektedir. MRSA suşlarının en belirleyici özelliği SCC*mec*'e sahip olmalarıdır. Bu hareketli genetik element *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu beta laktam direnci için önemli bir belirleyicidir. Metisilin dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkması duyarlı suşların kromozomlarına SCC*mec* elemanlarının kazanılması yolu ile olmaktadır (IWG-SCC 2009). SCC*mec* kasetinin kökeni hâlâ bilinmemektedir. Fakat *S. sciuri*'nin PBP ile MRSA'daki PBP2a arasında % 87,8 oranında homoloji bulunması nedeniyle, güncel bilgiler ışığında kökeninin bu bakteri olduğu düşünülmektedir (Said-Salim ve ark. 2003). SCC*mec* elemanları oldukça farklı yapısal organizasyonu ve genetik içeriği ile tip ve alt tiplere ayrılmıştır. Günümüze kadar yukarıda belirtilen kriterlere göre sekiz farklı SCC*mec* tipi tanımlanmıştır. İlk olarak tanımlanan SCC*mec* tip I, II ve III (Ito ve ark. 1999, Ito ve ark. 2001)'ü, SCC*mec* tip IV, V, VI, VII, VIII izlemiştir (Oliviera ve ar. 2006, Zhang ve ark. 2009). Çizelge 1.4. te *S. aureus* de belirlenen SCC*mec* tiplerinin taşıdıkları *ccr* gen ve *mec* gen kompleksleri verilmiştir.

Çizelge 1. 4. *S. aureus*'ta belirlenen SCC*mec* tipleri (IWG-SCC 2009)

SCC <i>mec</i> tipi	<i>ccr</i> gen kompleksi ^a	<i>mec</i> gen kompleksi
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4) ^b	A

^agen kompleksinde *ccr* genleri parantez içinde gösterilmektedir

^b*ccrA4B4* genleri SCC*mec* tip VIII'de bulunur

SCCmec tip I, II ve III esas olarak hastanede kazanılmış metisilin dirençli stafilokok (HK MRSA) suşlarında bulunur. Bunlar plazmid veya transpozable genetik elemanlar üzerinde taşınır. SCCmec tip II ve III çoklu beta laktam dışı antimikrobiyallere dirence neden olur. Bunun nedeni, tip II ve III elemanların kaset içine entegre olmuş plazmidler (pUB110, pI258 ve pT181) ile bir transpozon (Tn 554) aracılığıyla ek direnç genleri taşımalarıdır. Plazmid pUB110, kanamisin ve tobramisin direncinden sorumlu *ant(4')* genini; pI258 penisilin ve ağır metal direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşırken, Tn 554 ise indüklenebilir MLSb tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır. *S. aureus* SCCmec dışında kromozomun değişik bölümlerinde ya da plazmidler üzerinde de direnç elemanları içermektedir. SCCmec tip IV ve V tipik olarak TK MRSA suşlarında bulunur. Bu SCCmec tiplerinin boyutları daha küçüktür ve diğer çoklu ilaç direnç genlerini taşımazlar (Zaoutis ve ark. 2006). Bu gen kasetlerinin diğer gen kasetlerine kıyasla çok daha küçük olması diğer suşlara yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca bu gen kasetlerinde beta laktam dışı antibiyotiklere direnç geni bulunmaz. TK MRSA'da metisilin direnç kazanım mekanizması SCCmec gen kaseti aracılığıylaadır. Bu gen kasetinin boyutunun küçük olması ve hareketliliğini sağlayan genlere sahip olması nedeniyle, gelecekte ciddi sağlık problemlerine neden olması ve diğer Gram pozitif bakterilerde de görülmeye başlanması, gerekli önlemler alınmazsa kaçınılmaz bir son olacaktır (Ünal S 2006). TK MRSA prevalansında artış görülmesi ve insanların yanı sıra hayvan rezervuarlarının belirlenmesi ile araştırmalar farklı bir boyut kazanmıştır (Kollef-Micek 2006, Aygün ve ark. 2007). TK MRSA'nın hastane kaynaklı klonlardan köken alarak toplumda yayıldığı ya da MSSA *mecA* genini MRSA'lerden kazanarak toplumda dirençli kökenlerin yayıldığı şeklinde iki görüş üzerinde durulmaktadır (O'Rourke 2003). Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri Çizelge 1. 5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 1. 5. Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri (File 2008)

Suş	SCCmec Tipi	Antibiyotik Direnci	PFGE tip	Toksinleri	PVL genleri	İnfeksiyon spektrumu
HK MRSA	Tip I, II ve III	Çoklu direnç	USA 100	Az	Nadir	Kan, solunum ve üriner sistem infeksiyonları
TK MRSA	Tip IV ve V	Çoklu direnç görülmesine rağmen eritromisin ve beta laktamlara direnç tipik olarak sınırlıdır	USA 300	Genellikle PVL varlığında fazla	Yaygın	Deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve nekrotize pnömoni

MRSA yanısıra koagülaz negatif stafilokoklar da SCCmec taşıyabilir. 1970'li yıllarda izole edilmiş olan metisiline dirençli *S. epidermidis* izolatlarının SCCmec tip I-IV taşıdığı gösterilmiştir (Wisplinghoff ve ark. 2003). Hanssen ve ark. (2004) ise, 39 MRKNS izolatının 22'sinde yeni bir SCCmec tipi bulmuştur. İnegöl ve Türkyılmaz (2011) sığır ve çiftlik çalışanlarından izole edilen MRS'ların SCCmec tiplerini belirlemek amacıyla Aydın yöresinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında 59 MRS izole etmişlerdir. Bunların SCCmec tip II, III, IV ve V sırasıyla 2, 38, 18 ve 1 MRS izolatında belirlediklerini bildirmişler ve 1 tane süt orjinli *S. epidermidis* suşunun SCCmec tip V taşıdığını tespit etmişlerdir.

1. 7. 2. 3. Stafilokokal Protein A (*spa*) Dizi Tipleme: Stafilokokal protein A (*spa*) dizi tipleme yöntemi, Protein A geninin kısa tekrar bölgesi [short sequence repeat (SSR)] veya polimorfik X bölgesinin dizi analizine dayanmaktadır. Bu bölgeler yüksek polimorfizme sahiptir ve böylece salgın araştırmalarında ayırım için uygundur (Shopsin ve ark. 1999, Kurt ve ark. 2007). Polimorfik X bölgesi değişken 24 baz çiftlik tekrarları içermektedir ve C terminal hücre duvarı bağlanma dizisinin kodladığı bölgeye yerleşmektedir (Schneewind ve ark. 1992). SSR bölgesinin çeşitliliği, tekrarlayan dizilerin duplikasyonu ve delesyonu ile ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu durumdan nokta mutasyonları da sorumlu tutulmaktadır (Brigido ve ark. 1991). Biyolojik fonksiyonlarının bilinmemesine karşın, X bölgesi tarafından kodlanan Protein A, hücre duvarı proteinlerinin N-terminal immünoglobulin G bağlanma kısmının genişlemesini sağlamaktadır. *spa* SSR bölgesinin dizi analizi, MLST yöntemindeki birçok avantajın kombinasyonudur. Fakat *spa* tiplemesinin tek lokusu içermesinden beri hastane salgın araştırmalarında daha hızlı ve pratik bulunmuştur. *spa* tipleme metodunda ilk olarak yapılacak iş bakteriden DNA ekstraksiyonunun yapılmasıdır. İkinci işlem olarak spesifik primerler kullanılarak *spa* geninin X bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edilmesi ve bir sekans cihazı kullanılarak DNA dizilerinin belirlenmesidir. Daha sonra Ridom StaphType veri programları kullanılarak *spa* tipleri tanımlanır. Belirlenen *spa* tipleri özel programlar (internet yardımı) ile diğer ülkelerdekiler ile karşılaştırılır (Harmsen ve ark. 2003).

1. 7. 2. 4. Multilokus Dizi Tipleme (Multilocus Sequence Typing, MLST): Moleküler tiplendirme yöntemleri, sıklıkla aynı türe ait iki mikroorganizmanın aynı klondan olup olmadıklarını belirlemek için kullanılmaktadır. Pekçok bakteriyel türün virulans faktörlerinin ve moleküler epidemiyolojik özelliklerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. MLST housekeeping genlerin internal parçalarının DNA dizisindeki allelleri tanımlama dayalı bir yöntemdir. Örneğin reenfeksiyon ve re-aktivasyon ayırımı moleküler yöntemlerle

gerçekleştirilebilmektedir. Hastalıklara neden olan infeksiyon etkenlerinin tam identifikasyonu ve epidemiyolojik sürveyansı toplum sağlığı açısından oldukça önemlidir. Mikroorganizmaların genotiplendirilmesinde henüz kesinleşmiş ve standardize edilmiş bir yöntem yoktur. Birçok laboratuvarında halen, zayıf ayırım gücüne sahip, reaktiflerin sınırlı kullanıldığı, laboratuvarlar arasında ve içinde zayıf tekrarlanabilirliğe sahip farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bununla beraber yaygın olarak kullanılan tiplendirme yöntemlerinin günümüzdeki en önemli problemleri, farklı laboratuvarlar tarafından elde edilen sonuçların karşılaştırılmasındaki zorluklardır. MLST, moleküler biyolojide kullanımı giderek artan ve mikroorganizmaya ait birden çok lokusun tiplendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Yöntem ilk olarak 1990 yılında Prof. Dr. Brian Spratt, Martin Maiden, Dominique Caugant, Ian Feavers ve Mark Achtman tarafından geliştirilmiştir. MLST uygulamasından önce bakteri izolatları genellikle, jelde DNA fragmentlerine bakarak karakterize edilmekteydi. Fakat bu yöntemlerin çoğunda elde edilen verilerle laboratuvarlar arasında karşılaştırma yapmak çok zor olmaktadır (Maiden ve ark. 1998). MLST, ilk olarak meningokoksik menenjit ve septisemiye neden olan, *Neisseria meningitidis* üzerinde çalışılmıştır. Daha sonra bu teknik, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* ve diğer önemli patojenler için adapte edilmiştir. MLST, çok sayıda bakteriyel patojenin moleküler analizinde yaygın olarak kullanılır hale gelmiştir. Bu yöntemle virulan veya antibiyotiklere dirençli klonların tiplendirilmesi yanında, klonların evrimsel gelişimi de izlenebilmektedir. Yöntemin Klinik Mikrobiyoloji ve Halk Sağlığı Laboratuvarlarında çok geniş kullanımı bulunmaktadır (Maiden ve ark. 1998).

MLST, temel metabolik fonksiyonu kodlayan “house-keeping” genlerdeki değişikliğin DNA dizi analizi ile gösterilmesidir. Yedi “housekeeping” genin yaklaşık 450-500 baz çiftlik fragmentlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Örneğin *S. aureus* için bu genler ve kodladığı proteinler; *arcC*, karbamat kinaz; *aroE*, shikimate dehidrogenaz; *glp*, gliserol kinaz; *gmk*, guanilat kinaz; *pta*, fosfat asetiltransferaz; *tpi*, triosephosphate isomerase ve *yqiL*, asetil koenzim A asetiltransferaz’dır (Maiden ve ark. 1998, Feil 2007). Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterilmekte ve böylece suşa ait bir allelik profil tanımlanmaktadır. Tanımlanan allelik profiller, dizi tipi (sequence type=ST) olarak ifade edilmektedir. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle kıyaslanarak, tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Elektronik ortamda saklanabilir verilerin oluşturulabilmesi MLST’nin en önemli avantajlarından birisidir. Bu sayede yeni izolatlar daha öncekilerle kolay bir şekilde karşılaştırılabilmekte ve verilerin daha kolay paylaşımı mümkün

olabilmektedir (Maiden ve ark. 1998, Aanensen ve ark. 2005, Feil 2007). Klinik uygulamalarda araştırmacılar için bu veriler önemi giderek artan kullanım alanlarına sahiptir. Örneğın www.mlst.net adresinden internet yolu ile bu verilere hızlıca ulaşılabilmektedir.

Bir MLST çalışması için öncelikle kültür veya numunenin hazırlanması gerekmektedir. Sonra sırası ile DNA izolasyonu, MLST genlerinin PCR ile amplifikasyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizi analizi ve sonuçların bilgisayar ortamında sorgulanması gerekmektedir. MLST çok fazla avantaja sahip olmasına rağmen çeşitli zorluklara da sahiptir. Bu zorlukların başında 7 allel üzerinde çok düşük hata oranına sahip dizi analizi yapma zorunluluğu gelmektedir. Çoğu laboratuvar için bunları sağlayabilmek oldukça pahalı ve zaman alan bir süreçtir. Dizi analiz cihazları sıklıkla otomatize sistemlerdir ve bu sebeple pahalıdırlar (Maiden ve ark. 1998, Feil 2007).

Moleküler tiplendirme ve MRSA izolatları arasındaki evrimsel ilişkiler: 1990'lı yılların başlarından itibaren PFGE ile SmaI makrorestriksiyon patern analizi hem yerel ve uluslar arası epidemik suşların tanımlanmasını sağlamış hem de farklı *S. aureus* suşları arasında genetik ve evrimsel yakınlık bulunabileceğini göstermiştir (Struelens ve ark. 1993). Ancak suşların filogenetik ilişkilerinin tam olarak anlaşılması, dizi analizi tabanlı bir teknik olan MLST analizi ve SCC_{mec} elemanlarının gruplandırılması ile mümkün olmuştur (Enright ve ark. 2002, Oliveira ve de Lencastre 2002, Kondo ve ark. 2007). MLST analizinde, 7 farklı metabolik enzim geninde yaklaşık 450 bp'lik bir kısmın dizi analizi yapılarak suşun allelik profili belirlenmekte (=Sekans Tipi; ST) ve bir program yardımıyla bilinen dizilerle karşılaştırılmaktadır. Böylelikle ST'ler klonal soylar veya kompleksler (clonal complex; CC) içinde gruplandırılmaktadır. MLST, PFGE'den farklı olarak klon içerisindeki alt tipleri ve farklılıkları göstermez. PFGE ise bunları gösterdiği için salgın analizinde yararlıdır. Bunun dışında bazı kromozomal genlerin tekrar bölgelerindeki dizi polimorfizmine göre de tiplendirme yapılabilir. Buna örnek, *spa* (Protein A'yı kodlayan gen) tiplendirmesidir. *spa* geninin polimorfik X bölgesindeki tekrarlar hem tekrar sayısı hem de dizi ağıısından farklı olduğu için tiplendirme amacıyla kullanılmakta ve klonal soyları saptama ve tekrarlanabilirlik ağıısından MLST'ye eşdeğer sonuçlar vermektedir. Hastane ve toplum kökenli MRSA suşları, gerek epidemiyoloji gerekse evrimsel ilişkiler ağıısından birbirinden farklıdır. 1980'li yılların başlarından itibaren HK MRSA, Hollanda ve Kuzey Avrupa ülkeleri hariç tüm dünyada artış göstermektedir. Bu artış hastanelerde bazı epidemik klonların ortaya çıkması ve yayılmasına bağlıdır. Tüm dünyada bildirilen HK MRSA'lar 4 büyük klonal komplekste toplanan 11

klonun üyesidir. Bu klonlar arasında ST239, ST247, ST254, ST22, ST45 gibi bazıları kıtalararası yayılım göstermiştir. Bu klonların üyeleri genellikle hep aynı SCC*mec* elemanı veya varyantlarını taşıdıkları için, bu klonların farklı zamanlarda birbirlerinden bağımsız olarak evrimleşmek yerine kıtalararası yayıldıkları düşünülmektedir. Buna karşın ST5 veya ST8 gibi bazı klonal soylar farklı SCC*mec* elemanları taşıdıkları için bu klonların farklı zamanlar ve yerlerde farklı SCC*mec* elemanları olarak evrimleştikleri öne sürülmektedir (Enright ve ark. 2002, Deurenberg ve ark. 2007).

Hastane kökenli izolatların hastane içinde veya hastaneler arasında yayılımı ise daha önce hastanede yatmış ve MRSA ile infekte ya da kolonize hastalar aracılığıyla olmaktadır. Hastaneye girdikten sonra ise sağlık çalışanlarının elleri ile hastadan hastaya çapraz bulaş olmaktadır. Epidemik hastane kökenli MRSA suşlarının kolaylıkla yayılması bunların klonal soyları veya taşıdıkları genler ile ilişkilidir. Örneğin CC8 ve CC45 toplumda nazal kolonizasyon yapan MSSA izolatları arasında da siktir. Buna karşın toplumda kolonizasyon yapan CC15 ve CC25 klonlarında hiç MRSA izolatı bildirilmemiştir. Günümüze kadar 9 MRSA izolatının tam genom analizi yapılmıştır. Buna göre *S. aureus* genomu; 1. Kor genom, 2. Değişken kısım (aynı klonal soy içerisinde değişebilen toksin genleri, hücre duvarında bulunan matriks adezinleri vb), 3. Virulans ve antibiyotik direnç genleri taşıyan hareketli elemanlar (plazmidler, profajlar, transpozonlar, kromozomal kasetler) olarak üç kısma ayrılabilir. Bir klonal soyun epidemik olup olmaması büyük olasılıkla 3. grup genler ile ilişkilidir. Ayrıca MRSA infeksiyonlarının MSSA infeksiyonlarına göre mortalitesinin daha yüksek olmasının yine bazı klonal soyların içerdiği genetik elemanlar ile ilgili olabileceği öne sürülmektedir. Örneğin TW olarak adlandırılan ST239 suşunun daha sık olarak septisemiye yol açtığı bildirilmiştir. Mikroarray teknolojisi ile TW suşunun diğer ST239'larda değişik olarak bulunabilen farklı hareketli elemanları içerdiği belirlenmiştir (Edgeworth ve ark. 2007). HK MRSA izolatları değişik direnç belirleyicileri taşımaları nedeniyle genellikle çoklu dirençlidir. Bunun, suşun içerdiği SCC*mec* elemanı ile de ilişkisi vardır. Hastane kökenli suşlarda en sık bulunan SCC*mec* tipleri tip II ve III'tür. Bunlar içerisinde daha fazla direnç elemanı bulunduğu için bunları taşıyan klonal soylar daha dirençlidir.

PUL üreten toplum kökenli metisilin dirençli *S. aureus* (TK-MRSA)' a bağlı invaziv infeksiyonlarda ölüm oranı %35'e ulaşmıştır. (MalteZou ve Giamarellou 2006). MRSA'lar günümüzde insanlarda ve hayvanlarda önemli bir patojen haline gelmiştir. MRSA ile gelişen bulaşma ya da hastalıklar sonucunda, hayvanların taşıyıcı olması doğrudan insan sağlığını

tehdit etmektedir. Özellikle de veteriner hekimler, hayvan bakıcıları ve aileleri hayvanlarla yakın temas halindedirler. İnsan ve hayvanların karşılıklı olarak bu patojeni bulaştırması sonucunda TK MRSA'lar geniş bir rezervuar potansiyeline ulaşmıştır. Günümüzde TK MRSA'lara karşı yeterli önlemin alınmamasının yanı sıra mücadelenin de zor olması nedeniyle bu bakteriler gelecekte ciddi sağlık sorunları oluşturabilecektir. Bu çalışmada insan ve sığır orjinli MRSA suşlarında önemli virulens faktörlerinden birisi olan PVL genlerinin varlığının PCR ile belirlenmesi, bu izolatların SCC_{mec} tipi ve *spa* analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

2. 1. 1. 1. Süt: Bu çalışmada, 2008-2010 yılları arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, 38 küçük ve orta ölçekli (1–25 baş arası sağmal inek) sığır işletmesi ziyaret edilerek, hepsi laktasyon döneminde olan, son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3-9 yaşları arasında Holştayn ırkı, 430 inek Kalifornia Mastitis Testi (CMT) ile incelenerek subklinik mastitisli olarak belirlenen, 208 inekten 484 süt örneği alındı.

2. 1. 1. 2. Burun Sıvı: Süt örneği alınan subklinik mastitisli 56 inekten, bu inekler ile yakın temasta olan 34 insandan olmak üzere toplam 90 burun sıvı örneği alındı.

2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2. 1. 2. 1. Besiyerleri

2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar.....	40 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril insan kanı ilave edildi.

2. 1. 2. 1. 2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)

MSA ayırt edici ve seçici bir besi yeridir. Stafilokokların saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermantasyonunun gözlemlenmesi için MSA kullanıldı.

Mannitol Salt Phenol Red Agar.....	108 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, onbeş dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2. 1. 2. 1. 3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

Mueller-Hinton Agar.....	38 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,3±0,2	

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. 45–50°C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml döküldü.

2. 1. 2. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (%20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

BHIB	8 g
Gliserin	20 ml
Distile su.....	80 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2. 1. 2. 1. 5. Trypton Soya Broth-TSB (%7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

TSB.....	8 g
NaCl.....	75 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2. 1. 2. 1. 6. Stuart Transport Medium (BBL™)

Kullanılan besi yerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

Sodium Thioglycollate	1.0 g
Sodium Glycerophosphate	10.0 g
Calcium Chloride	0.1 g
Methylene Blue	2.0 mg
Agar	3.0 g

2. 1. 2. 2. Solusyonlar

2. 1. 2. 2. 1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2H ₂ O.....	186,1 g
--------------------------------------	---------

EDTA 800 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121°C'de onbeş dakika otoklav edildi.

2. 1. 2. 2. 2. TBE (Tris Borik Asit EDTA, pH: 8,0) Buffer

10x konsantrasyonda stok solusyon aşağıdaki gibi hazırlandı:

Tris Base.....	121, 10 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de onbeş dakika otoklav edilip, pH 8,0'e ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5x konsantrasyonda kullanma solusyonu aşağıdaki gibi hazırlandı:

10x TBE.....	50 ml
--------------	-------

Distile Su..... 950 ml

Karıştırılarak 121°C’de onbeş dakika otoklav edilip, pH 8,0’e ayarlanarak hazırlandı, kullanma solusyonu buzdolabında saklandı.

2. 1. 2. 2. 3. Gel Loading Buffer (6 X)

Bromofenol mavisi..... 25 mg
Sukroz 4 g
H₂O 10 ml’ye

tamamlandı.

2. 1. 2. 2. 4. Tris (1 M)

Tris Base 121 g

Tris base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6’ya ayarlanarak karışım 1000 ml’ye tamamlandı. 121°C’de onbeş dakika otoklav edildi.

2. 1. 2. 3. Antibiyotik Diskleri

Metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin (Oxoid, 30µg) diskinden, stafilokok ve mikrokok ayırımının yapılmasında ise basitrasin (Oxoid, 0,04 İU/ml) diskinden yararlanıldı.

2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PCR 96 örnek kapasiteli Eppendorf MasterCycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirildi.

2. 1. 3. 2. MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl) 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

2. 1. 3. 3. Primerler

Metisilin dirençli(*mecA*), *S. aureus* spesifik thermonuclease (*nuc*) ve MRSA suşlarında PVL genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler, dizileri, amplicon büyüklükleri ve primerlerin alındığı kaynaklar Çizelge 2. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Kullanılan primerler, dizileri, amplicon büyüklükleri ve kaynak

Primer	Dizi (5'-3')	Amplicon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>mec A F</i> <i>mec A R</i>	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	Oliveira ve de Lencastre 2002
<i>nuc F</i> <i>nuc R</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	Kim ve ark. 2001
<i>PVL F</i> <i>PVL R</i>	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACATGA TCCA GCA TCA AST GTA TTG GATAGC AAA AGC	433	Lina ve ark. 1999

PVL geni pozitif MRSA suşunun *Staphylococcus aureus* Protein A (*spa*) ve *SCCmec* tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler ve amplicon uzunlukları sırasıyla Çizelge 2. 2. ve Çizelge 2. 3'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. *spa* tipi belirlenmesinde kullanılan primerler, dizileri ve kaynak

Primer	Dizi (5'-3')	Kaynak
<i>spa 1113 F</i> <i>spa 1514 R</i>	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	http://www.spaserver.ridom.de/

Çizelge 2. 3. *SCCmec* tipi belirlenmesinde kullanılan primerler dizilimleri, amplicon büyüklükleri ve *SCCmec* tipi (Oliveira ve de Lencastre 2002)

Primer	Dizi (5'-3')	Amplicon büyüklüğü (bp)	<i>SCCmec</i> Tipi
<i>CIF2 F2</i> <i>CIF2 R2</i>	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I
<i>KDP F1</i> <i>KDP R1</i>	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II
<i>MECI P2</i> <i>MECI P3</i>	ATCAAGACTTGCATTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	II, III
<i>DCS F2</i> <i>DCS R1</i>	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I, II, IV
<i>RIF4 F3</i> <i>RIF4 R9</i>	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	243	III
<i>RIF5 F10</i> <i>RIF5 R13</i>	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	III
<i>IS431 P4</i>	CAGGTCTCTTCAGATCTACG		

pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC	381	IA
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG		
pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	303	IIIA

2. 1. 4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, 80 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2. 1. 4. 1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)	1,5 g veya 2 g
TBE (0,5x)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3–5 dk. kaynatılan karışım, 40–50°C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15–20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2. 1. 4. 2. Marker

Marker olarak 100 bp lik DNA ladder (Fermentas) kullanıldı.

2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka %1'lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5x TBE içerisine 100 µl miktarda eklenerek kullanıldı.

2. 1. 4. 4. Standart Suşlar

Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisilin dirençli *S. aureus* N315 (SCCmec Tip II) kontrol olarak kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Örneklerin Alınması

2. 2. 1. 1. Sütler: Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı (Baştan 2002). Steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı.

2. 2. 1. 2. Burun Sıvap: Sürüntüler her iki taraf burun konkasının 1/3'lük ön kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a konuldu.

Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar çalışmalarına başlandı. İncelemesi yapılan tüm sığır ve insan materyalleri hayvan sahipleri bilgilendirilip, izin alınarak temin edildi.

2. 2. 2. MRSA İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden stafilocokların saf olarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için, burun sıvap örnekleri önce %7,5 tuzlu TSB'a ekilip, 37°C'de 24 saat inkube edildi, buradan MSA'a geçildi. Süt örnekleri ise doğrudan MSA'a ekildi. MSA'da 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen stafilocok suşları, fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agara pasajlandı. Stafilocok suşlarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak gerçekleştirildi (Murray 2003).

2. 2. 2. 1. Fenotipik İdentifikasyon

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz, basitrasın duyarlılık, tüp koagulaz testleri aşağıdaki anlatıldığı şekilde yapılarak gerçekleştirildi.

2. 2. 2. 1. 1. Katalaz Testi: Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınıp temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H₂O₂'i su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendi. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirildi.

Streptococcus spp. katalaz negatif, *Micrococcaceae* familyasındaki *Micrococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. ise pozitifdir (Murray 2003).

2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Duyarlılık Testi: Katalaz pozitif mikroskopik olarak Gram pozitif kok görünümündeki mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubunda kabul edildi. Bu suşlardan tek bir koloni TSB'da üretildikten sonra MHA'a ekim yapılmış ve ekim bölgesinin üzerine basitrasin diski yerleştirildi. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* spp. olarak ayrıldı (Koneman ve ark 1997).

2. 2. 2. 1. 3. Koagülaz Testi: Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagülaz testleri tüpte gerçekleştirildi. Bunun için incelenecek koloni, içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) bulunan bir tüpe ekildi. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlendi. Koagülaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu KPS, katılaşma meydana gelmiyorsa KNS olarak değerlendirildi. Elde edilen tüm KPS suşları daha sonra kullanılmak üzere, %20 gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de saklandı.

2. 2. 2. 1. 4. Sefoksitin Duyarlılık Testi: İzole edilen stafilokok suşlarının metisilin dirençleri fenotipik olarak sefoksitin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine (Bauer 1966) göre MHA kullanılarak belirlendi. Bunun için izole edilen suşlar %7 koyun kanlı agar besi yerine pasajlanıp, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen yeni kültürlerden TSB besiyerlerine 0,5 McFarland'a (10^8 bakteri/ml) uygun süspansiyonlar hazırlandı. Her bakteri türü için ayrı hazırlanan süspansiyonlardan 15 dakika içinde steril eküvyon ile inokulum tekniğe uygun olarak 25 ml steril MHA'a yayılarak ekimleri yapıldı. Ekim yüzeyinin kuruması için oda ısısında 10-15 dk. beklendikten sonra antibiyotik diski ucu alevden geçirilmiş olan pensle besi yerine yerleştirildi. 37°C'de 18 saat inkübe edilen suşların inhibisyon zon çapları ölçülerek; sonuçlar duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlandı. Zon çapı *S. aureus* için 19 mm'den küçük veya eşit olan suşlar MRSA olarak belirlendi (CLSI 2006).

2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon

Fenotipik olarak MRSA olduğu belirlenen tüm izolatların genotipik identifikasyonları *nuc* ve *mecA* genleri varlığının spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmesi sonucunda yapıldı. PCR için öncelikle izolatlardan kromozomal DNA ekstraksiyonu yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Metisilin dirençli *S. aureus* suşlarından total DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, Katalog No: 732-6030, BIO-RAD, München, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- *Bir öze dolusu stafilokok kültürü 1 ml steril bir ependorf tüp içerisinde steril enjeksiyonluk distile su ile süspanse edildi.
- *12.000 rpm.de 1 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- *200 µl InstaGene matrix pelet üzerine ilave edildikten sonra 56°C’de yarım saat inkübe edildi.
- *Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Tüpler benmaride 100°C’de 8 dk inkübe edildi.
- *Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. 12.000 rpm.de 3 dk santrifüj yapıldı.
- *30 µl’lik bir PCR reaksiyonu için 2 µl süpernatant kullanıldı.

2. 2. 2. 2. 1. PCR

Genotipik olarak MRSA olduğu belirlenen tüm suşlarda PVL genlerinin varlığı incelendi. PVL pozitif MRSA suşunun SCC*mec* tipinin belirlenebilmesi amacı ile SCC*mec* ve *spa* tipinin belirlenebilmesi amacı ile *spa* analizleri yapıldı.

Tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2. 4.’de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 4. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	24
dNTP (10mM)	0,2 mM	6
Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2
Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl / 50 µl	1,8
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	235,8
TOPLAM		300

Mastermiksin hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanılan mastermiksdan ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenerek ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *nuc*, *mecA*, PVL ve *spa* analizlerinde kullanılan PCR işleme ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2. 5., Çizelge 2. 6., Çizelge 2. 7.'ve Çizelge 2.8' de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 5. *nuc* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	35	94°C	30 sn
Bağlanma		50°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

Çizelge 2. 6. *mecA* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	35	94°C	30 sn
Bağlanma		50°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

Çizelge 2. 7. PVL PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon		94°C	30 sn

Bağlanma	30	56°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PVL pozitif MRSA suşlarının kısa sürede belirlenebilmesi amacı ile multipleks PCR gerçekleştirdi. PVL spesifik PCR’da metisilin direnci için spesifik *mecA* geni, *S. aureus* için spesifik *nuc* geni ve PVL genleri daha önce bildirilen primerler kullanılarak çoğaltıldı. Bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polymerase 1,5U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıdaki Çizelge 2. 8.’de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 8. PVL spesifik PCR mastermiksın hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	50
MgCl₂ (25mM)	2 mM	60
dNTP (10mM)	0,2 mM	10
<i>mec</i> Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	2
<i>mec</i> Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	2
<i>nuc</i> Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	2
<i>nuc</i> Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	2
PVL Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	2
PVL Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	2
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl / 50 µl	3,6
dH₂O	Son Volüme Tamamlanır	385
TOPLAM		500

Mastermiks hazırlandıktan sonra ardından 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 45’er µl hazırlanan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan 5’er µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Program 94°C’da 10 dakikalık denatürasyonu takiben 35 siklus 94°C 1,5 dk, 49°C 1,5 dk ve 72°C 1,5 dk tamamlandıktan sonra, 72°C’de 10 dk ile sona erdirildi (Çizelge 2. 9.).

Çizelge 2. 9. Multipleks PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	10 dk
Denatürasyon	35	94°C	1,5 dk
Bağlanma		49°C	1,5 dk
Uzama		72°C	1,5 dk
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PVL geni pozitif olan bir adet MRSA suşunun SCCmec tipi multipleks PCR kullanılarak daha önce bildirildiği şekilde gerçekleştirildi (Oliveira ve de Lencastre 2002). Bunun için öncelikle multipleks PCR’da kullanılmak üzere SCCmec primer miski hazırlandı: KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 ve RIF4 R9 primerleri 200 nM; CIF2F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 ve pT181R1 primerleri 400 nM; DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7 ve IS431 P4 primerleri de 800 nM konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Mastermixin her 50 µl’si için bu primer miskinden 1 µl ilave edilerek PCR gerçekleştirildi. Multipleks SCCmec PCR, PVL pozitif MRSA olarak belirlenen suşa uygulandı.

Bir örnek için PCR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, master miskinin her 50 µl’si için 1 µl SCCmec primer miksi, Taq DNA polimerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıdaki Çizelge 2. 10.’da belirtilmiştir.

Çizelge 2. 10. SCCmec mastermixin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	24
dNTP (10mM)	0,2 mM	6
SCCmec primer miks	1 µl / 50 µl	6
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl / 50 µl	1,8
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	232,2
TOPLAM		300

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 mL’lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28’er µl hazırlanan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA’dan 2’şer µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip,

programlandı. Program 94°C'da 4 dk başlangıç denatürasyonu takiben 30 siklus 94°C 30 sn, 53°C 30 sn ve 72°C 1 dk'da tamamlandıktan sonra, 72°C'de 5 dk ile sona erdirildi (Çizelge 2. 11.). Multipleks PCR yöntemi ile SCC_{mec} tip I, II, III ve IV tespiti yapıldı.

Çizelge 2. 11. SCC_{mec} PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	4 dk
Denatürasyon	30	94°C	30 sn
Bağlanma		53°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

PVL geni pozitif olan bir adet MRSA suşunun *spa* tipi spesifik primerler kullanılarak daha önce bildirildiği şekilde gerçekleştirildi (<http://www.spaserver.ridom.de/>). Çizelge 2.12.'de *spa* analizi için gerçekleştirilen PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı verilmiştir.

Çizelge 2. 12. *spa* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	80°C	5 dk
Denatürasyon	35	94°C	45 sn
Bağlanma		60°C	45 sn
Uzama		72°C	90 sn
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların Elektroferez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipetin ucuna 1 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen 5 µl PCR ürünleriyle karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yüklendi.

2. 2. 2. 2. 3. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroferez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 40 dk yürütüldü.

2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dk boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapıldı. Bunun için *mecA* primerleri için 162 bp (Oliveira ve ark. 2001), *nuc* primerleri için 279 bp (Kim ve ark. 2001), PVL primerleri için 433 bp (Lina ve ark. 1999), SCC*mec* tip tayini için (Oliveira ve de Lencastre 2002): Tip I'de 342, 381 ve 495 bp; Tip II'de 209, 284 ve 342 bp; Tip III'de 209, 243, 303 ve 414 bp ve Tip IV'de 342 bp uzunluğunda bant aranırken; *spa* primerleri için ise net bir bant görüntülenmesi (<http://www.spaserver.ridom.de/>) sağlandı.

3. BULGULAR

3. 1. MRSA Taşıyıcılığı

Çalışmada 38 işletmeden 430 ineğin CMT ile subklinik mastitis yönünden incelenmesi sonucunda CMT pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) gösteren 208 ineğe ait 484 süt örneği saptandı. Bu ineklerin 106 tanesinden toplam 244 stafilokok suşu izole edildi. Otuz dört insan ve 56 inek olmak üzere toplam 90 burun sıvap örneğinin hepsinden stafilokok izolasyonu yapıldı. İncelenen 244 süttten 8 (8/244=%3,3), 90 nazal sıvaptan 10 (10/90=%11,1) olmak üzere toplam 18 MRSA suşu izolasyonu yapıldı.

3. 1. 1. Sığır Sütlerinde

Çalışmada stafilokok izolasyonu yapılan 106 ineğe ait 244 süt örneğinin incelenmesi sonucunda 8 inekten 8 tane MRSA suşu belirlenmiştir. İneklerde %7,6 (8/106) ve sütlerde %3,3 (8/244) oranında MRSA tespit edildi.

3. 1. 2. İnsan ve Sığır Nazal Sıvaplarında

Otuzdört insandan 6, 56 sığırdan 4 olmak üzere alınan toplam 90 burun sıvap örneğinin 10'undan MRSA izolasyonu yapıldı. Nazal MRSA taşıyıcılığı insanlarda %17,6 (6/34), sığırlarda %7,1 (4/56) oranında tespit edildi. Metisilin dirençli ve metisilin duyarlı birer *S. aureus* suşunun disk difüzyon yöntemi ile görünümü Resim 3. 1.'de gösterilmiştir.

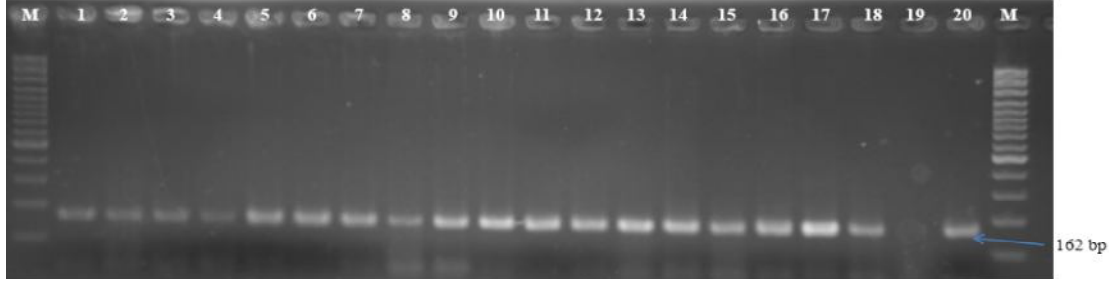


Resim 3. 1. Metisilin duyarlı ve dirençli birer *S. aureus* suşu

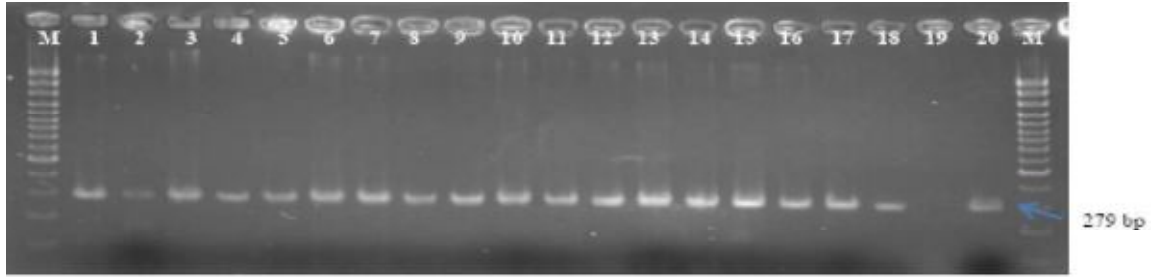
3. 2. PCR

mec primerleri kullanılarak yapılan PCR'da 162 bp (Resim 3. 2.); *nuc* primerleri kullanılarak yapılan PCR'da 279 bp (Resim 3. 3.); PVL primerleri kullanılarak yapılan

PCR'da 433 bp (Resim 3. 4.); PVL pozitif MRSA suşu ile gerçekleştirilen Multipleks PCR'da 162 bp, 279 bp, 433 bp (Resim 3. 5.) uzunluğunda bant görülmüştür.



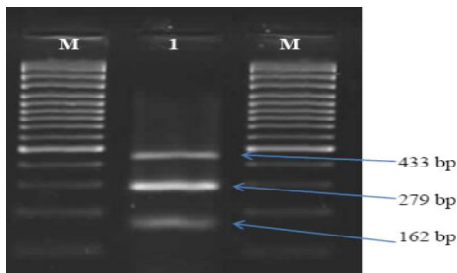
Resim 3. 2. *mec* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR. **1–18:** *mec* geni pozitif stafilokok izolatları (162 bp), **19:** Negatif Kontrol (*S. aureus* ATCC 29213 suşu) **20:** Pozitif Kontrol (*S. aureus* N315 suşu), **M:** 100 bp DNA ladder



Resim 3. 3. *nuc* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR. **1–18:** *nuc* geni pozitif stafilokok izolatları (279 bp), **19:** Negatif Kontrol (*E. coli* 25922 suşu) **20:** Pozitif Kontrol (*S. aureus* N315 suşu), **M:** 100 bp DNA ladder



Resim 3. 4. PVL primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR. **1–18:** MRSA izolatları (18' nolu örnek 433 bp pozitif) **M:** 100 bp DNA ladder



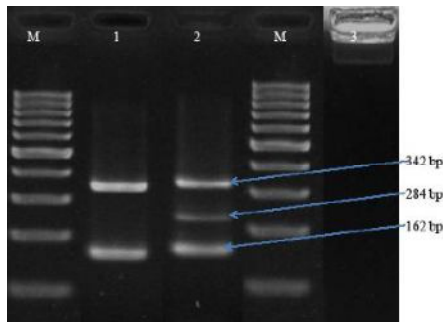
Resim 3. 5. Multipleks PCR. **1:** PVL pozitif *S. aureus* saha suşu (162 bp, 279 bp, 433 bp) **M:** 100 bp DNA ladder

PCR sonrasında incelenen toplam 18 MRSA suşundan bir tanesinde PVL genlerinin pozitif olduğu spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrasında tespit edildi. Çalışmada PVL pozitif bir kontrol suşu temin edilemediği için elde edilen ampikon sekans analizi için özel bir firmaya (Macrogen Inc.,1001 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Elde edilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanıldı. Resim 3. 6.'da Nucleotid Blast ile PVL geni dizisi sorgulama sonucu verilmiştir. Buna göre elde edilen izolatın PVL geni pozitif bir suş olduğu sekans analizi ile de doğrulanmış oldu.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP002110.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH60, complete genome	654	2568	84%	0.0	99%
AB532026.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
AB532025.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
AB532024.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
FJ821791.1	Staphylococcus aureus strain ER4 panton-valentine leukocidin S (lukS)	654	654	37%	0.0	99%
AB488779.1	Staphylococcus aureus lukPVS, lukPVF genes for Panton-Valentine le	654	654	37%	0.0	99%
FJ713816.1	Staphylococcus phage phiPVL-CN125, complete genome	654	654	37%	0.0	99%
AP009363.1	Staphylococcus phage phi2958PVL proviral DNA, complete sequeunce	654	654	37%	0.0	99%
EU518770.1	Staphylococcus aureus strain HT20060855 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518769.1	Staphylococcus aureus strain HT20050287 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518768.1	Staphylococcus aureus strain HT20030826 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518766.1	Staphylococcus aureus strain HT20040994 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518765.1	Staphylococcus aureus strain HT20020383 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518764.1	Staphylococcus aureus strain HT20010461 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EU518763.1	Staphylococcus aureus strain HLY19990053 LukS-PV (lukS-PV) gene,	654	654	37%	0.0	99%
EF571836.1	Staphylococcus aureus strain US78 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571835.1	Staphylococcus aureus strain US74 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571788.1	Staphylococcus aureus strain UK48 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571787.1	Staphylococcus aureus strain UK47 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571786.1	Staphylococcus aureus strain UK46 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571785.1	Staphylococcus aureus strain UK45 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571784.1	Staphylococcus aureus strain UK44 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571783.1	Staphylococcus aureus strain UK43 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571780.1	Staphylococcus aureus strain UK40 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571779.1	Staphylococcus aureus strain UK12 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571778.1	Staphylococcus aureus strain SA99 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571777.1	Staphylococcus aureus strain SA98 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571776.1	Staphylococcus aureus strain SA97 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%
EF571775.1	Staphylococcus aureus strain SA96 PVL toxin gene, partial cds	654	654	37%	0.0	99%

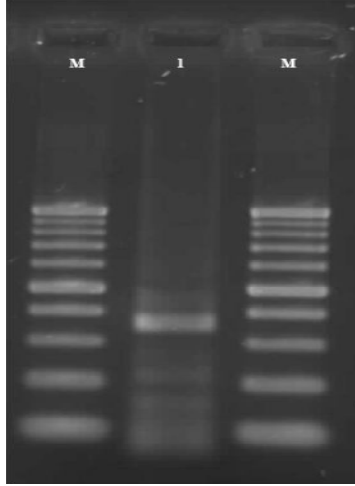
Resim 3. 6. Nucleotid Blast ile PVL geni dizisi sorgulama sonucu

PVL pozitif olarak bulunan bir MRSA suşunun multipleks PCR ile SCCmec tipinin SCCmec Tip IV olarak belirlendi (Resim 3. 7.).



Resim 3. 7. PVL pozitif suşun SCCmec tipi **M**: Marker: 100 bp DNA ladder, **1**: SCCmec tip IV (162 bp, 342 bp) **2**: Pozitif Kontrol *S. aureus* N315 suşu (SCCmec tip II) (162 bp, 284 bp, 342 bp pozitif) **3**: Negatif Kontrol (metisilin duyarlı *S. aureus* ATCC 29213)

Sığır sütünden izole edilen bir adet PVL pozitif MRSA suşunun *spa* tiplendirme sonucunda Protein A'nın varlığı tespit edildi. Yaptığımız işlemlerde amplifikasyonun doğru bir şekilde yapılıp yapılmadığını test etmek için jel elektroforez yöntemini kullanıldı. Resim 3.8.' de *spa* PCR sonrasında elde edilen bant profili gösterilmiştir.



Resim 3. 8. *spa* PCR 1: PVLgeni pozitif *S. aureus* suşu M: 100 bp DNA ladder

Elektroforez işleminde istenilen uzunlukta net bir bant görüntülenmesi sonucunda elde edilen ampikon sekans analizi için gönderilinceye kadar -20°C 'de saklandı. Yapılan çalışmada, *spa* genlerinin DNA dizi analizi otomatik DNA dizi analiz cihazıyla MacroGen Firması tarafından yapıldı. Firma tarafından gerçekleştirilen DNA örneklerinde baz dizileri belirlenmiş ve izolatın baz dizilimi Resim 3.9. da verilmiştir.

```
GGATTTTRGCGAGCTAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACAAAAGAGGAAGACAACAACAACCTG  
GTAAAGAAGACCGCAMCAAACCTGGCAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAA  
AAAACCTGGTAAAGAAGACAACAACAACAACCTGGTAAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGCAAAGAA  
GACAACAACAACAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAGT  
AAATGACATTGCAAAAAGCAAACGGCACTACTGCTGATAWAAACAAACCYASTCCGGWCGGATCSG  
WCCCTGTGCGAWGKGRAATTGATTTTGTTTTGTTCCTATTTTGAATT
```

Resim 3. 9. PVL pozitif MRSA suşunun DNA örneğinde baz dizisinin gösterilmesi (<http://www.macrogen.com>.)

Elde edilen DNA dizileri StaphType yazılım programının yardımı ile *spa* tiplerinin belirlenmesi için kullanıldı. Elde edilen *spa* tipleri internet yardımı ile Ridom SpaServer adresinden diğer bilgileri elde edildi. İzolatın tekrar bölgeleri 07-23-12-34-34-33-34 olarak belirlenirken *spa* tipinin t044 olduğu tespit edildi.

4. TARTIŞMA

S. aureus insanları kolonize ve infekte edebilen Gram pozitif bir bakteridir. Burun, boğaz ve deride zararsız bir şekilde taşınmaktadır. Kluytmans ve ark. tarafından yapılan bir çalışma popülasyonun 1/3'ü sürekli *S. aureus* ile kolonize halde ve her zaman aynı suşu taşıdığını, 1/3'ünün geçici olarak farklı *S. aureus* suşlarını taşıdığını, 1/3'ünün ise *S. aureus* kolonizasyonuna dirençli olduğunu göstermiştir (Kluytmans ve ark. 1997). *S. aureus* için antibiyotik direnci ilk olarak 1950'lerde, bu bakteriye ait suşların, kendilerinin penisilin yok eden β -laktamaz enzimi üretmelerini sağlayan genler edinmeleriyle ortaya çıkmıştır. Bu durum, *S. aureus* ve diğer bakteriler tarafından üretilen penisilin yok eden enzimlere dirençli, metisilin ve flukloksasilin gibi yarı sentetik penisilinlerin geliştirilmesi ve kullanımına neden olmuştur. MRSA ilk olarak bu ajan klinik uygulamaya girdikten hemen sonra 1961'de tanımlanmıştır. Stafilokoklar büyük bir olasılıkla birkaç milyon yıldır çeşitli ortamlarda penisilin üreten küflerle karşılaşmaktadır ve MRSA direnci muhtemelen *S. aureus*'un daha yeni beliren penisilin yok edici enzimlerine göre daha ilkel bir penisilin direnci tipi teşkil etmektedir. Bu durum, sağlık hizmeti sunumu ile ilişkisi olmayan bölgelerde, toplumdan edinilen MRSA infeksiyonlarının ortaya çıkışını kısmen açıklayabilir (Cookson 2000). Antibiyotiklerin 1970'ler boyunca yaygın bir biçimde kullanımı, başta MRSA'larda olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişimine yol açmıştır. MRSA suşları çok bulaşıcı olmaları, patojenitelerinin yüksek olması ve antibiyotiklere dirençli olmaları veya çabuk direnç kazanabilmeleri gibi nedenlerden dolayı önem taşımaktadır. Aydın yöresinde izole edilmiş olan insan ve sığır orjinli MRSA suşlarında önemli virulens faktörlerinden birisi olan PVL genlerinin varlığının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada, sığır süt orjinli bir izolatta yurdumuzda ilk kez mastitisli inek sütlerinden izole edilen MRSA' larda PVL pozitif MRSA suşlarının varlığı belirlenmiştir.

SCCmec tip IV içeren toplum kökenli PVL pozitif MRSA suşları, insanlarda öldürücü nekrotize pnömoni vakalarından ve tekrarlayan deri infeksiyonlarından artan oranlarda

görülmesine karşın (Gillet 2002); hayvanlarda PVL üreten TK MRSA suşları nadir olarak bildirilmektedir (Van Duijkeren ve ark. 2005). MSSA ile karşılaştırıldığında klinik infeksiyon/kolonizasyon oranı TK-MRSA' da daha yüksektir. Bunun nedeni TK-MRSA' da virulan PVL genlerinin yüksek taşınma oranı gösterilmektedir (Vandenesch ve ark. 2003). PVL üreten TK MRSA kedi, köpek, tavşan, kuşlarda (Rankin ve ark. 2005), yarasa, kaplumbağa, domuzlarda (Voss ve ark. 2005, Walther ve ark. 2008) ve sığırlarda (Kwon ve ark. 2005) bildirilmiştir. Bu çalışmada Aydın ilinde son iki yıl içerisinde mastitisli sığır sütlerinden, insan ve sığır nazal sıvaplardan izole edilmiş olan 18 MRSA suşunda PVL genlerinin varlığının incelenmesi sonucunda sığır süt orjinli bir MRSA suşunun PVL pozitif olduğu belirlenmiştir. Sığırlarda PVL pozitif ilk MRSA suşu Kore'den bildirilmiştir (Kwon ve ark. 2005). Ikawaty ve ark. (2010) Hollanda' da mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri 76 *S. aureus* suşunun hiç birisinde PVL pozitif olmadığını bildirirken Fueyo ve ark. (2005)' da benzer bir şekilde subklinik mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında PVL geni içeren suş bulunmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Zecconi ve ark.(2006) inceledikleri izolatlarda pul pozitifliğini %50 den fazla bulduklarını bildiren tek araştırmacıdır. PVL özellikle toplum kökenli *S. aureus* suşları tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL pozitif *S. aureus* suşlarının ortalama %2-10 arasında değiştiğini bildirmektedir (Lina ve ark. 1999, Morgan 2008).

Yurdumuzda hayvanlarda MRSA suşlarında PVL genlerinin varlığının incelendiği tek çalışma Türkyılmaz ve ark. tarafından yapılmış ve çalışmada sığır süt orjinli 16 MRSA suşunun PVL genlerini taşımadığı bildirilmiştir. Bu çalışma, Türkiye'de mastitisli sığır sütlerinden izole edilen TK MRSA izolatlarında PVL genlerinin belirlendiği ilk çalışma olması açısından önemlidir.

Sığır mastitisleri tüm dünyada olduğu kadar Türkiye'de de ekonomik önemi olan hastalıklardan birisidir. *S. aureus* sıklıkla sığır mastitis vakalarından izole edilen ve bu nedenle veteriner mikrobiyoloji açısından önemli olan etkenlerdir. Metisilin direnci sığırlarda ilk 1972 yılında bildirildiğinden (Devriese ve Homes 1975) bu yana hem yurdumuzda hem tüm dünyada tüm hayvanlarda (Juhász-Kaszanyitzky ve ark 2007, Leonard ve Markeley 2006, Vangerhaeghan ve ark. 2010) MRSA varlığının incelendiği çalışmalar yapılmıştır. Türkiye'de mastitisli süt örneklerinde metisilin direncinin fenotipik yöntemler kullanılarak incelendiği çalışmalarda farklı yörelerde farklı MRSA oranları (%0,0-%60) bildirilmiştir (Ak ve ark. 2000, Güler ve ark. 2005, Hadimli ve ark. 2001, Uçan ve Aslan 2002, Türütoğlu ve ark. 2006, Kırcan ve ark. 2005). *mecA* geninin yalnızca fenotipik olarak disk diffüzyon yöntemi

ile belirlenmesi yeterli değildir, hatalı pozitif ve negatif sonuçlar çıkabileceğinden elde edilen bulguların moleküler yöntemlerle de doğrulanması oldukça önemlidir (Murakami ve ark. 1991).

Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış en kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışma Türkyılmaz ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sefoksitin direncinin MRSA suşlarında %17,2 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada yine Aydın yöresinde son iki yılda (2008-2010) incelenen 430 ineğin 208'inden subklinik mastitis saptanmış ve bunların 106 tanesinde stafilokok izolasyonu yapılmıştır. 106 ineğe ait 244 süt örneğinin incelenmesi sonucunda 8 inekten 8 tane MRSA suşu belirlenmiştir. İneklerde %7,6 (8/106) ve sütlerde %3,3 (8/244) oranında MRSA varlığı tespit edilmiştir. Vanderhaeghan ve ark. Belçika'da yaptıkları çalışmalarında klinik ve subklinik mastitisli sütlerde yaklaşık %10 olarak bulmuşlar ve ülkelerinde MRSA oranının beklenmedik bir şekilde yüksek çıktığını vurgulamışlardır (Vangerhaeghan ve ark. 2010). Metisilin direnci yöreden yöreye, ülkeden ülkeye değişebilmektedir. Ancak alınan sonuçlar, yurdumuzda da metisilin direncinin önümüzdeki yıllarda önemli bir sorun olabileceği düşündürmektedir.

Tarihsel olarak evcil hayvanları etkileyen MRSA suşları, epidemik MRSA (EMRSA) klonları da dahil olmak üzere, insan nazokomial infeksiyon suşlarına benzerlik göstermektedir (Loeffler ve ark. 2005, Rich ve ark. 2005). Bu epidemik hastane kökenli MRSA klonları köpeklerde görüldüğü zaman etkenin direkt insanlardan hayvanlara bulaştığı düşünülmüş ve MRSA için "humanosis" terimi kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte bu durum hayvanlarda kolonize olan ve insanları etkileyen suşların moleküler epimemiyolojik yöntemler kullanılarak incelenmesi ile daha iyi açıklığa kavuşturulmaya başlanmıştır. Örneğin, özellikle domuzları etkileyen MRSA suşları arasında ST398'in önemi MLST analizlerinin yapılması ile artmıştır. ST398'in t011, t034, t108, t567, t899 ve t939'un dahil olduğu farklı *spa* tiplerini içerdiği (Van Duijkeren ve ark. 2007), Fransız ve Alman MRSA suşlarının çoğunluğunun ST398 ve *spa* tipinin t108 olduğu (Armand-Lefevre ve ark. 2005) ve bu tipin Hollanda'da insanlarda görülen MRSA suşlarının %20'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Van Loo ve ark. 2007). Türkiye'de 2008 yılına kadar yapılan çalışmalarda görülen *spa* tipleri: t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443 (Deurenberg ve Stobberingh 2008) olarak bildirilmektedir. Yurdumuzda MRSA suşlarının moleküler epidemiyolojilerinin çalışıldığı en kapsamlı çalışma Yıldız ve ark tarafından 2010 yılında bildirilmiştir. Çalışmada Türkiyede 2005- 2007 yılları arasında izole edilen 7 bölgedeki 12 hastaneden izole edilen 397 suşun moleküler epidemiyolojik analizleri

yapılmış 8 ulusal 4 bölgesel klon varlığı bildirilmiştir. 359 suşun SCCmec Tip III, 4 suşun Tip I ve 30 suşun Tip IV olduğu; 4 suşunda tiplendirilmesinin yapılamadığını bildirmişlerdir. Ulusal klonların hepsinin ST239, bölgesel klonun bir tanesi ST97 üç tanesinin de ST737 olduğu; yalnızca 5 suşun PVL pozitif olduğu bunlardan ikisinin ST80 ve SCCmec Tip IV oldukları bir tanesinin SCCmec type IV and ST8 olduğu bildirilmiştirlerdir. Bu çok merkezli çalışma Türkiye’de en yaygın ulusal MRSA klonunun ST239-SCCmec III (bu klon Brezilya klonu olarak bilinmektedir); bölgesel klon ST737 SCCmec IV olarak belirlenmiştir. (Yıldız ve ark. 2010). Akoğlu 2004-2005 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi’nde izole edilen 110 MRSA suşunun %61,8’ inin SCCmec tip III, %34,5’ inin SCCmec varyant tTip IIIB, %2,7’ sini SCCmec tip IV olarak saptamış ve izolatların %12,7’ sinde (14 suşa) PVL geni pozitif bulmuştur. PVL pozitif olan 1 suşu SCCmec III ve 4’ ü SCCmec varyant tip III B olarak saptamıştır. SCCmec tip IV olarak saptanan suşların hiçbirisinde PVL geni gösterilmemiştir. Toplum kökenli MRSA’ nın bilinen bir virulans faktörü olan PVL, hastane kökenli metisilin dirençli *S. aureus* (HK-MRSA)’ nın izolatlarında da önemli oranda arttığını saptamıştır. Bu durumda MRSA izolatlarının değişen epidemiyolojilerinin yakından takibinin önemli olduğunun bir göstergesidir.

Prashanth ve ark (2011) 22 *S. aureus* suşundan 3 suşun PVL pozitif olduğunu bildirirlerken; sığır mastitis orjinli 34 suştan hiçbirisinin PVL pozitif olmadığını bildirmişlerdir.

Karahan ve ark. ülkemizde toplum kökenli *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %15’inin, hastane kökenli izolatların ise %0,34’ünün PVL genlerini taşıdığını belirtmişlerdir (Karahan ve ark. 2008). Bir diğer büyük çalışma Kılıç ve ark. (2008) tarafından 4.050 çocuktan alınan nasal sıvaplardan izole edilen MRSA’lar üzerine yapılmıştır. Çalışmada çocuklarda MRSA görülme oranının %0,07 olduğunu, izolatların SCCmec tip IV, ST30 olduklarını ve PVL genlerini içermediklerini bildirmişlerdir. Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış moleküler epidemiyolojik tek çalışma Türkyılmaz ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Aydın yöresinde izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direnç oranının sefoksitin direncinin MRSA suşlarında %17,2 olduğu bildirilirken; moleküler tiplendirme yöntemleri içerisinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile suşlar arasındaki klonal ilişki incelenmiş alt tipleri ile birlikte üç pulsotip belirlenmiştir. Pulsotip B olan suşların SCCmecTip IV, t190 ve ST8 olduğu; pulsotip A ve C’nin ise SCCmec TipIII, t030 ve ST 239 (pulsotip A) ve ST239 benzeri (pulsotip C) oldukları, suşların hiçbirisinde PVL toksin genine de rastlanmadığı bildirilmiştir. Çalışmada 16 MRSA suşunun 14’ünün hastane kaynaklı MRSA ST239-III olduğu ve bunun MRSA’nın insanlardan hayvanlara bulaşmış

olabileceğini gösterdiği vurgulanırken; MRSA ST8/IV suşlarının varlığının yörede toplum kökenli suşların da bulunduğunu gösterdiği bildirilmiştir (Türkyılmaz ve ark. 2010). Yapılan bu çalışmada ise PVL geni pozitif olarak bulunan suşun SCCmec tip IV olduğu *spa* tipinin ise t044 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma mastitisli sığır sütlerinde Türkiye’de PVL gen varlığının belirlendiği ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. t044 Cezayir, Avusturalya, Avusturya, Belçika, Bulgaristan, Hırvatistan, Danimarka, Finlandiya, Fransa, Almanya, İrlanda, Libya, Hollanda, Norveç, Romanya, Singapur, İspanya, İsveç, Tunus, İngiltere, Yugoslavya gibi dünyanın pek çok ülkesinde görüldüğü bildirilmiştir (Deurenberg ve Stobberingh 2008). PVL pozitif t044’ün Avrupa’da en sık görülen TK MRSA suşu olduğu bildirilmektedir (Witte ve ark. 2007, Fenner ve ark. 2008, Soliman ve ark. 2009,). Şu anki bilgilerimize göre Türkiye’de veteriner sahada *spa* tipi t044 olan bir suş bulunmamaktadır. Çalışma aynı zamanda t044’ün Türkiye’de veteriner sahada ilk kez görüldüğünün bildirilmesi açısından da önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmalar PVL genlerine metisiline duyarlı *S. aureus* suşlarında da rastlanabileceği bildirilirken (Ikawaty ve ark. 2010) SCCmec tip IV ve PVL arasındaki ilişkinin incelenmesi ile ilgili olarak yapılmış çalışmalar oldukça azdır (Deurenberg ve Stobberingh 2008). Bazı araştırmalarda PVL’nin TK MRSA suşlarında bulunan önemli bir genetik belirteç olduğunu bildirilirken (Vandenesch ve ark. 2003, Tristan ve ark. 2007), Avustralya’da yapılan bir çalışmada PVL pozitif TK MRSA suşları ile SCCmec tip IV arasında bir ilişki belirlenemediği bildirilmiştir (O’Brien ve ark. 2004). İrlanda ve Kore’de yapılan çalışmalarda da PVL’nin TK MRSA suşlarında düşük oranda bulunan genetik bir belirteç olduğu bildirilmiştir. İrlanda’da toplum kökenli izoletların %7’den daha azının PVL taşıdığı, Kore’de ise TK MRSA izolatlarının çoğunluğunun PVL negatif ST1-MRSA IV ve ST72-MRSA IV klonları olduğu tespit edilmiştir (Kim ve ark. 2007a, Park ve ark. 2007, Rossney ve ark. 2007). Almanya’da yapılan bir çalışmada PVL pozitif TK MRSA suşlarının SCCmec tip I ve III taşıdığı bildirilirken (Wannet ve ark. 2005) Kore’de (Jeong ve ark. 2007) ve Cezayir’de (Ramdani-Bouguessa ve ark. 2007) benzer bir şekilde PVL pozitif HK MRSA izolatlarında SCCmec tip I ve II taşıdığı tespit edilmiştir. Genellikle, PVL pozitif MRSA suşlarının %40-90’ı SCCmec tip IV taşırken, %5’den az bir kısmı SCCmec tip I-III taşımaktadır (Deresinski 2005). Bu çalışmada da PVL pozitif olarak belirlenen suşun TK MRSA olan SCCmec tip IV taşıdığı belirlenmiştir. Yapılan çalışma SCCmec tip IV ve PVL arasındaki ilişkinin incelenmesi ile ilgili olarak bundan sonra yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacaktır.

S. aureus suşlarında metisilin direnci ile birlikte PVL genleri pozitif olan suşların kısa sürede belirlenebilmesi uygun tedavi stratejilerinin zaman kaybedilmeden başlanabilmesi açısından önem taşımaktadır. *S. aureus nuc* geni bu bakteri tarafından üretilen TNase tarafından kodlanmaktadır. *S. aureus* TNase tür spesifiktir ve *nuc* geninin amplifikasyonu ile *S. aureus* infeksiyonlarının hızlı teşhisi yapılabilmektedir (Brakstad ve ark. 1992). Türkiye’de mastitis tedavinde kloksasillin dışında metisilin ya da oksasillin türevi bir antibiyotik kullanılmamaktadır (Türütoğlu ve ark. 2006). MRSA suşlarının belirlenmesinde seçilecek olan metodun faydalı, güvenilir, basit ve hızlı olması oldukça önemlidir. Disk difüzyon testleri gibi fenotipik yöntemler MRSA suşlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler zaman almakla birlikte hatalı sonuçlar verebildiği bilinmektedir (Araj ve ark. 1998). *mecA* geninin belirlenebilmesi için moleküler yöntemlerin kullanılması altın standart olarak kabul edilmekte, çabuk ve güvenilir olduğu bildirilmektedir (Araj ve ark. 1998). Çalışmada PCR’nun *S. aureus nuc* ve *mecA* geni taşıyan suşları hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilebildiği için kullanılabilmesi görülmüştür. Bununla birlikte PVL pozitif MRSA suşlarının belirlenebilmesi için *S. aureus* spesifik *nuc* geni, metisilin direnç geni olan *mec* geni ve PVL genlerinin çoğaltılması multipleks PCR reaksiyonu da gerçekleştirilmiş ve yöntemin PVL geni pozitif MRSA suşlarının belirlenebilmesi için pratik ve uygulanabilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde başka bir çalışmada da PVL, SCC*mec* tip IV ve *S. aureus* 16S rRNA genleri multipleks PCR ile çoğaltılmış ve multipleks PCR’ın MRSA TK suşların belirlenebilmesinde kullanılabilecek hızlı, duyarlı, güvenilir ve pratik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Moussa ve ark. 2008).

5. SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye’de mastitisli sığır sütlerinden izole edilmiş olan MRSA izolatlarında PVL genlerinin varlığı ilk kez tespit edilmiştir. İnsanlarda başta nekrotize pnömoni ve yumuşak doku lezyonlarına sebep olan PVL toksini üreten *S. aureus* suşları hayvanlarda da tedavisi zor vakalardan izole edilmektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar MRSA suşlarının insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiğini göstermiştir. PVL pozitif MRSA suşları ile infekte hayvanlar, insan infeksiyonları için bir kaynak olabilmektedir; bununla birlikte, günümüzde insanların da artık aynı şekilde hayvanları infekte edebilecekleri alternatif bir hipotez olarak öne sürülmektedir. Sonuç olarak yurdumuzda mastitisli sığır süt orjinli PVL pozitif TK MRSA suşunun SCCmec tip IV taşıdığı ve *spa* tipinin t044 olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların epidemiyolojik özelliklerinin incelenmesi, etkilerinin azaltılması ve kontrol önlemlerinin alınabilmesi için önemlidir. Ayrıca bir stafilokok suşunun PVL genini içermesi, zaten oldukça ağır seyreden stafilokokal mastitits vakalarının daha ağır seyretmesine neden olurken; bir taraftan da PVL pozitif suşlar ile de insan varlığı açısından da risk teşkil etmektedirler.

PVL genlerinin stafilokok türleri arasında yayılması, stafilokoklara bağlı infeksiyonların yol açtığı morbidite ve mortalite oranlarını arttıracığından, PVL pozitif stafilokokların yayılmasını önleyecek sıkı tedbirlerin alınması gerekmektedir.

ÖZET

Hazımoğlu BŞ. *Staphylococcus aureus* suşlarında Panto-Valentine lökosidine genlerinin araştırılması

Bu çalışmada, insan ve sığır orjinli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında Panton Valentine lökosidin (PVL) genlerinin varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi, bu izolatların stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC*mec* tipi) ve *Staphylococcal Protein A* (*spa*) analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Çalışmada subklinik mastitisli olarak belirlenen 208 inekten 484 süt örneği ile 56 inek ve 34 insandan alınan toplam 90 nazal sıvı örnekleri materyal olarak kullanıldı. Fenotipik olarak metisilin dirençli olarak belirlenen 18 MRSA izolatı, genotipik olarak metisilin direnç (*mec*) ve *S. aureus* spesifik thermonuclease (TNase) (*nuc*) genlerinin incelenmesi ile genotipik olarak MRSA oldukları doğrulandı. İzolatlarda PVL genlerinin varlığı, multipleks PCR ile spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada Türkiye’de ilk kez sığır süt orjinli bir izolatın PVL geni pozitif olduğu belirlendi. Bu izolatın SCC*mec* tipinin SCC*mec* Tip IV ve *spa* tipinin t044 olduğu tespit edildi. Hayvanlarda, PVL pozitif MRSA suşlarının neden oldukları infeksiyonların Türkiye’deki durumunun açıklığa kavuşturulabilmesi için, bu konuda daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, Panton Valentine lökosidin, SCC*mec*, *spa* tiplendirme, sığır mastitis, Türkiye.

SUMMARY

Hazımoğlu BŞ. Investigation of Panton-Valentine Leukocidine (PVL) genes in *Staphylococcus aureus* isolates

The aim of this study is determine the presence of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes in methicilline resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains that originated from farm workers and dairy cows with Polimerase Chain Reaction (PCR) and to analyse the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and *Staphylococcal Protein A* (*spa*) types of these isolates. The material of this study were consisted to 484 milk samples taken from 208 subclinic mastitic dairy cows and 90 nasal swabs taken from 56 dairy cows and 34 farm workers. As phenotypically, 18 MRSA isolates that were determined as methicilline resistant were also genetically confirmed as to be MRSA with the investigation of the methicilline resistant (*mec*) and *S. aureus* specific thermonuclease (TNase) (*nuc*) genes. The presence of PVL genes in this isolates was revealed with multiplex PCR using spesific primers. It was the first in this study that one isolate determined as PVL positive originated from bovine milk in Turkey. And SCC*mec* type of this isolates was determined as SCC*mec* Type IV while *spa* type determined as t044. To investigate the precise status of the infections caused by PVL positive MRSA strains in farm animals in Turkey further epidemiologic studies should be designed.

Key words: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Panton Valentine leukocidine, SCC*mec*, *spa* typing, bovine mastitis, Turkey.

KAYNAKLAR

Ak S. Trakya yöresinde sığır mastitisinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotiklere duyarlılıkları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2000;26(2):353-365.

Akoğlu H. Hacettepe Üniversitesi erişkin hastanesinde 2004-2005 yıllarında hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının moleküler tiplendirmesi. Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 2007.

Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006 539-576.

Anonim 1. [Staph Toxin Can trigger deadly pneumonia, Forbes. 2007-10-18.](http://www.forbes.com/forbeslife/health/feeds/hscout/2007/01/18/hscout601101.html)
<http://www.forbes.com/forbeslife/health/feeds/hscout/2007/01/18/hscout601101.html>.
Retrieved on 2007-10-18. Erişim Tarihi: 12.06.2011.

Anonim 2. [Staphylococcus aureus toxin can cause necrotizing pneumonia](http://www.medscape.com/viewarticle/550968) . Medscape.
<http://www.medscape.com/viewarticle/550968>. Retrieved on 2007-01-18.
Erişim Tarihi: 01 Haziran 2011.

Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs. Emerging Infectious Disease 2005;11:711-4.

ARMed-EARSS overall country report 2003-2004, www.earss.rivm.nl Erişim Tarihi: 10.05.2011.

Aanensen DM and Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Research 2005;33:728-733.

Araj GF, Talhouk RS, Siman CJ, Maasad MJ. Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal Antimicrobial Agent 1998;11:47-52.

Arciola RC, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. Expert Review of Molecular Diagnostics 2002;2:478-84.

Aybay C, Çağlar K, İmir T *Staphylococcus epidermis* kaynaklı slaym maddesinin makrofajlardan nitrik oksit salınımına etkisi. İnfeksiyöz Dergisi 1997;11:353-6.

Aygün F, Hatipoğlu N, Somer A, Keser M, Tuğrul MZ, Salman N. Toplum kökenli MRSA; Bir olgu sunumu. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Poster Bildiriler 1. Bölüm, Çocuk Enfeksiyöz Dergisi 2007;1:107-25.

Barber M. 1961 Methicillin-resistant *Staphylococci*. Journal of Clinical Pathology 14:385-93.

Baştan A. İneklerde Meme Hastalıkları. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 1. baskı., 2002 p. 441-7.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility testing by a standardised single disk method. American Journal of Clinical Pathology 1966;445-493.

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

Borg MA, Kraker M, Scicluna E, Van deande B, Tiemersma E, Monen J, Grundmann H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern mediterranean countries. Journal Antimicrobial Chemother 2007;60(6):1310-5.

Bremell T, Lange S, Yacoub A, Ryden C, Tarkowski A. Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis in mice. Infection and Immunity 1991;59:2615-2623.

Brigido MDM, Barardi CR, Bonjardin CA, Santos CL, Junqueira ML, and Brentani RR. Nucleotide sequence of a variant protein A of *Staphylococcus aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. Journal Basic Microbiology 1991;31:337-345.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th Ed. New York: McGraw-Hill, 2007. p. 818.

Cengiz AS. Koagülaz Negatif Stafilokoklar. Cengiz AT(editör) Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, TÜRKİYE. 2004. p. 351-60.

Cengiz AT. Staphylococcus. Ustacelebi S(editor).Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitabevi,1999. p. 339-348.

Cheung, AI, Projan SJ, Edelstein RE, Fischetti VA. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. Infection and Immunity 1995;63:1914-1920.

Christensen GD, Baldassari L, Simpson WA. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: Bisno A, Waldvogel FA(editors). Infections Associated with Indwelling Medical Devices. 2 nd Ed. Washington DC: ASM Pres, USA 1994. p. 45-78.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. Approved standard MS100-S16. Wayne, PA, 2006.

Couppie P, Cribier B, Prevost G. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: An epidemiologic study. Archives Dermatology 1994;130:1208-1209.

Cookson BD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community: new battlefronts, or are the battles lost. Infectious Control Hospital Epidemiology 2000;21:398-403.

Cribier G, Prevost G, Couppie P, Finck-Barbancon V, Grosshans E, Piemont Y. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infection. An epidemiological and experimental study. *Dermatology* 1992;185:175-180.

Deurenberg R, Stobberingh EE. The evaluation of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 2008;8:747-763.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ. Sentry Participants Group. 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, *Clinical Infectious Disease* 2001;32(Suppl 2):p. 114-32.

Denys J, Van de Velde H. Sur la production d'une antiLökosidine chez les lapin vaccinés contre le staphylocoque pyogène. *La Cellule* 1895;11:359-72.

Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Disease* 2005;40:562–573.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Infectious* 2007;13(3):222-35.

Devriese LA, Homes J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy herds. *Research Veterinary Science* 1975;19:23–7.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review* 2000;13:16-34.

Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, Etienne J, Richet H. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clinical Infectious Disease* 2002;35:819-824.

EARSS 2005 Annual report, www.eurosurveillance.org. Erişim Tarihi: 12.05.2011.

Edgeworth JD, Yadegarfar G, Pathak S, Batra R, Cockfield JD, Wyncoll D, Beale R, Lindsay JA. An outbreak in the intensive care unit of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 239 associated with increased rate of vascular access device related bacteremia. *Clinical Infectious Disease* 2007;44(4):493-501.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spralt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceeding of the National Academy Science, USA*, 2002;99(11):7687-92.

Feil E. Molecular evolution, recombination and population structure of microbial pathogens. *IMS, Imperial College* 2007.

Fenner L, Widmer A, Dangel M, Freil R. Distribution of spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital. *Journal of Medical Microbiology* 2008;57: 612–616.

File TM. Methicilline resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): focus on community-associated MRSA. *South African Journal of Epidemiology and Infection* 2008;23:13–15.

Fluit AC, Schmitz FJ. (ed.). MRSA: current perspectives. Norfolk: Caister Academic Press, 2003.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* 11th edition. Inc: Mosby; 2002.

Fong IW, Kolia M. MRSA in the 21st century: emerging challenges. In: Fong and Karl Darlica (eds). *Reemergence of established pathogens in the 21st century*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 2003. p. 99-138.

Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology* 1998;6:484-488.

Franklin DL. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 1998;339:520-32.

Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muñiz J, Alvarez MA, Martín MC. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005;1278-1284,(43):3.

Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prevost G. Characterization of a novel of the bi-component staphylococcal leucotoxins family structural member, LukE-LukD. *FEBS Letter*. 1998;436, 202–208.

Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of FnB genes. *Molecular Microbiology* 1995;17:1143-1152.

Gillet B, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bès M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002;359:753-759.

Gür D. Temel tıptan kliniğe; beta-laktamazlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002;33(2):102–9.

Gülay Z. Gram pozitif bakteri infeksiyonları: direnç ve epidemiyolojisi. *ANKEM Dergisi* 2008;22(Ek 2):276-286.

Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* 2005;88:3149–54.

Gladstone GP, Van Heyningen WE. Staphylococcal Lökosidins. British Journal of Experimental Pathology 1957;38:123-37.

Gladstone GP, Mudd S, Hochstein HD, Lenhart NA. The assay of anti-staphylococcal leucocidal components (F and S) in human serum. British Journal of Experimental Pathology 1962;43:295-312.

Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T. Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilokokların β -laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıklar. Veteriner Bilimler Dergisi 2001;17: 21–25.

Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer. Antimicrobial Agents Chemother 2004;48(1):285-96.

Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 1984;158:513-6.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41:5442-8.

Hawkes N. Baby' s death linked to hospital bug, <http://www.timesonline.co.uk/article/0,2-2516306,00.html>. Retrieved on: 22 Aralık 2006. Erişim Tarihi:12 Haziran 2011.

Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, Leitch CD, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk, JAMA 1998;279(8):593-8.

Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance Lancet Infectious Diseases 2001;1:147–55.

Ikawaty R, Brouwer EC, Wan Duirskeren E, Mevius D, Verhoef J. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Nedherlands. International Journal of Dairy Science, 2010;5(2):60-70.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* elements. Antimicrobial Chemother, 2009;12:4961–67.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotid sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrobial Chemother 1999;43:1449-58.

Ito TY, Katayama K, Asada N, Mori K, Tsutsumimoto C, Tiensasitorn K Hiramatsu. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* intergrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2001;45:1323-1336.

İnegöl E, Türkyılmaz S. Determination of SCC*mec* types in methicillin resistant staphylococci isolated from cows and farm workers. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakülte Dergisi* 2011, Baskıda.

Jeong HY, Lee JE, Choi BK, Seo KW, Park SH, Kim YL, Baek KM, Lee K, Rhee DK. Molecular epidemiology of community-associated antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea 2003: pervasiveness of multidrug-resistant SCC*mec* type II methicillin-resistant *S. aureus*. *Microbial Drug Resistance* 2007;13:178–185.

Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistant in *Staphylococci*. *Lancet* 1963;1:904-7.

Jonsson K, Signas C, Muller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry* 1991;202:1041-1048.

Johansson A, Flock JI, Svensson O. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics* 2001;382:241-246.

Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, Bloois LG, Duijkeren E, Wagenaar JA. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:630-2

Julanielle LA. Studies of hemolytic staphylococci. Hemolytic activities, biochemical reactions, serological reactions. *Journal of Infectious Diseases* 1922;1:256-84.

Kaneko J, Kimura T, Narita S, Tomita T, Kamio Y. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* 1998;215:57-67.

Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slaym aktiviteleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Dergisi* 2001; 31:224–6.

Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCC*mec* types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microbial Drug Resistance* 2008;14:203-210.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; 44:1549–55.

Keskin O, Altay G, Akan M. Farklı hayvansal kaynaklardan izole edilen koagulaz negatif stafilokoklarda slime üretimi ve adherans. *Turk Journal of Veterinary Animal Science* 2003;27:253-7.

Kılıç A, Güçlü AÜ, Şenses Z, Bedir B, Aydoğan H, Başustaoğlu AC. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and Pantone-Valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008;94:607–614.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey. *Turk Journal of Veterinary Animal Science* 2005;29:791–96.

Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WE, Tripathy DN, Jr Kerhli M, Oluoch AO, Kakoma I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 2001;84:74–83.

Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, Park WB, Kim SH, Bang JH, Kim DM, Park KU, Shin S, Lee MS, Choi HJ, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Kim HB, Choe KWA. Survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *Journal Antimicrobial Chemother* 2007a;60:1108–1114.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci: Part–1: Staphylococci and related organisms. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth Edition. New York: The Lippincott; 1997. p. 539–76.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents Chemother* 2007;51(1):264-74.

Kollef MH, Micek ST. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen? *Current Opinion in Infectious Disease* 2006;19:161-68.

Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10:505-20.

Kurt D Reed, Mary E Stemper, and Sanjay K Shukla. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of MRSA. In *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols* Ebook MRSA protocol. Yinduo Ji. 2007;321:59-70.

Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Seok YJ, Park, YH. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemother* 2005;56:624–32

Lammers A, Nuijten PJM, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiology Letters* 1999;180:103-109.

Leonard FC, Abbott Y, Rossney A, Quinn PJ, O Mahony R, Markey BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice. *Veterinary Record* 2006;158:155-59.

Leonard FC, Markey BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. A review. *Veterinary Journal* 2008;175:27-36.

Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A brief history of *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leucocidin. 2010 www.antimicrobe.org

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gaudochon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Disease* 1999;29:1128–32.

Loeffler A, Boag AK, Sung J. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemother* 2005;56:692–7.

Lyon BR, Gillespie MT, Byrne ME, May JW, Skurray RA. Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*: the involvement of a transposon. *Journal of Medical Microbiology* 1987; 23:101-10.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:3140-3145.

MalteZou HC, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal Antimicrobial Agents* 2006;27:87-96.

Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1986;167:975-80.

McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 1994;11:237-248.

McGavin MH, Krajewskapietrasik D, Ryden C, Hook M. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infection and Immunology* 1993;61:2479-2485.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Volume 2, Elsevier Inc 2005.p. 2321-2352.

Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infection and Immunology* 1995; 63:4738-4743.

Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis. *Journal of Antimicrobial Chemother* 2008;10:1093-1105.

Moussa I, Shibl AM. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from outpatient clinics in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Medicine Journal* 2008;30:611-617.

Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Diseases* 1993;17:153–162.

Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:2240-44.

Murray PR, Patrick R. *Manuel of clinical microbiology*, 8th ed. *Clinic Microbiology*, Bölüm 1. Washington DC: ASM Pres; 2003., p.3.

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

Neisser M, Wechsberg F. Über das Staphylo toxin. *Z Hyg Infektkrankh* 1901;36:299-349.

Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Hook M, Foster TJ. *Molecular Microbiology* 1998;30:245-257.

O'Brien LM, Walsh EJ, Massey, RC, Peacock SJ, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type 1 cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cellular Microbiology* 2002;4:759-770.

O'Brien FG, Lim TT, Chong FN, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA, Monk A, Said-Salim B, Kreiswirth BN, Grubb WB. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *Journal Clinical Microbiology* 2004;42:3185-3190.

Ogston A. Report upon microorganisms in surgical diseases. *British Medical Journal* 1881;1:369-37.

Ogston A. Über Abscesse. *Architec Klinik Chirurg* 1880;25:588-600.

Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:19430-19432.

Oliveira DC, Milheiriço C, Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec Type VI. *Antimicrobial Chemother* 2006;10:3457-59.

Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Chemother* 2002;46:2155-61.

Oliveira DC, Tomasz A ve Lencastre H. The evolution of pandemi clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microbial Drug Resistance*. 2001;7:349-361.

O'Rourke K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging problem in horses? *J American Veterinary Medical Association* 2003;223:1399-01.

Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald JR, Josefsson E, Tarkowski A. Fibronectinbinding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *Journal Infection Disease* 2005;191:791-798.

Parker Weld JT, Gunther A. Differentiation between certain toxic properties of filtrates of hemolytic *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 1931;1:315-22.

Pasteur LD. l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de queques maladies communes. *C.R. Séances Société de Biologie de Paris* 1880;90:1035-44.

Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Rydén C, Höök M. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infection and Immunology* 1994;62:152-161.

Park C, Lee DG, Kim SW, Choi SM, Park SH, Chun HS, Choi JH, Yoo JH, Shin WS, Kang JH, Kim JH, Lee SY, Kim SM, Pyun BY. Predominanceof community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying staphylococcal chromosome cassette mec type IVA in South Korea. *Journal Clinical Microbiology* 2007;45:4021–4026.

Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Rosenbloom J, Mecham RP. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:15803-15809.

Panton NP, Valentine FCO. Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932;222:506-8.

Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunology* 2002;70:4987-4996.

Peacock SJ. *Staphylococcus*. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10. bask1. London: Hodder Arnold; 2005. p. 771-832.

Prévost G, Couppier P, Prévost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piemont Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *Journal of Medical Microbiology* 1995a;42:237-45.

Prashanth K, Rao KR. Genotypic characterisation of *S. aureus* obtained from humans and bovine mastitis samples in India. *Journal of Global Infectious Disease* 2011;3(2):115-22.

Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, Monteil H, Piemont Y. Panton-Valentine Lökosidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunology* 1995b;63:4121-4129.

Projan SJ, Novick RP. The Staphylococci in Human Disease pathogenicity. *In: Crossley KB, Archer GL (Eds.). The molecular basis of Churchill.* New York: Livingstone Inc.; 1997. p. 55-81.

Proom H. The inter-relationships of staphylococcal lökosidins. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1937;44:425-9.

Rahman A, Izaki K, Kato I, Kamio Y. Nucleotide sequence of leukocidin S-component gene (lukS) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991;181:138-44.

Rahman A, Nariya H, Izaki K, Kato I, Kamio Y. Molecular cloning and nucleotide sequence of leukocidin F-component gene (lukF) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;184:640-6.

Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M, Etienne J. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. *Antimicrobial Agents Chemother* 2006; 50:1083–1085.

Rankin S, Roberts S, O'Shea K, Maloney D, Lorenzo M, Benson CE. Panton Valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Veterinary Microbiology* 2005;108:145-148.

Rice LB. Antimicrobial resistance in gram positive bacteria. *American Journal of Infection Control* 2006;34(5):11-9.

Rich M, Roberts L, Kearns AM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Veterinary Microbiology* 2005;105:313-4.

Richardson JF, Aparicio P, Marples RR, Cooksoon BD. Ribotyping of *Staphylococcus aureus*: an assessment using well-defined strains. *Epidemiology Infection* 1994;112:93-101.

Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwards, G, O'Brien FG, Tenover FC, McDougal LK, Monk AB, Enright DC. Reemergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet* 2005;365(9466):1256-8.

Rosenbach FJ. Mikro-organismen bei den. Wund-infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, Germany: Wiesbaden JF Bergmann; 1884. p.19-21.

Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Moren oCA, Mehta Y, Higuere F, Cuellar LE, Arıkan ÖA, Abouqal R, Leblebicioğlu H, International Nosocomial Infection Consortium. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Annals Internal Medicine* 2006;145(8):582-91.

Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (PVL) reveal that PVL is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:2554–2563.

Sader HS, Watters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin resistant enterococci isolates in European Medical Centers, 2005 *BMC Infectious Diseases* 2007;7(1):29.

Said-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infectious Control Hospital Epidemiology* 2003;24:451-5.

Schneewind O, Model P, and Fischetti VA. Sorting of Protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* 1992;70:267-281.

Schaffer AC, Solinga RM, Cocchiario J, Portoles M, Kiser KB, Risley A, Randall SM, Valtulina V, Speziale P, Walsh E, Foster T, Lee JC. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and Immunology* 2006;74:2145-2153.

Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 genotype as a major cause of health care associated blood stream infections. *Clinic Infectious Disease* 2006;42(5):647-56.

Shanson DC. Anticibiotic-resitant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection* 1961;2:11-36.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, kreiswirth BN. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of strains. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:3556–3563.

Siqueira JA, Speeg-Schatz C, Freitas FI, Sahel J, Monteil H, Prevost G. Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *Journal of Medical Microbiology* 1997;46:486-494.

Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cellular Microbiology* 1999;1:101-117.

Soliman RS, Phillips G, Whitty P, Edwards D. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spa types isolated from health-care workers and patients in a Scottish university teaching hospital. *Journal of Medical Microbiology* 2009;58:1190–1195.

Struelens MJ, Bax R, Deplano A, Quint WG, Van Belkum A. Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31(8):1964-70.

Supersac G, Prevost 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. *Infection and Immunity* 1993;61:580-587.

Suzanna F, Bradley F. The role of toxins in the changing epidemiology and clinical presentation of staphylococcal pneumonia, 2006-02-22 <http://www.medscape.com/viewarticle/521338> 6. Retrieved on: 2007-12-08. Erişim Tarihi:12 Haziran 2011.

Switalski L, Patti JM, Butcher, W, Gristina AG, Speziale P, Höök M. A collagen receptor of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Molecular Microbiology* 1993;7:99-107.

Tenover FC, Arbeit RD, Archer G. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 2:407–415.

Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O. European antimicrobial resistance surveillance system participants: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10(9):1627-34.

Timbury MC, McCartney A, Thakker B. Notes on Medical Microbiology. In: Livingstone C. New York, USA: Elsevier Limited; 2002. p. 31-34

Todar K. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1994.

Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, Courvalin P, Reverdy ME, Enright MC, Vandenesch F, Etienne J. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:594–600.

Tung HS, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Ryden C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochemical Journal* 2000;345:611-619.

Turnridge JD, Bell JM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution in Australia over 35 years. *Microbial Drug Resistance* 2000;6(3):223-9.

Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Health* 2010;57:197–203.

Türütöglü H, Erçelik S, Öztürk D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull Veterinary Institute Pulawy* 2006;50:41-45.

Tünger A. *Staphylococcus aureus*. Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. p. 9-68.

Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Asya Mikrobiyoloji*. İzmir, TÜRKİYE:Asya Tıp Kitapevi; 2005. p. 71-85.

Trülzsch K, Grabein B, Schumann P. *Staphylococcus pettenkofferi* sp. nov., coagulase negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007;57:1543–1548.

Uçan US, Aslan E. İnek mastitislerinden izole edilen koagulaz pozitif stafilokok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 2002;18:19-22.

Ünal S. Toplumda kazanılmış metisillin dirençli *Staphylococcus aureus*: Genetik özellikler. *Ankem Dergisi* 2006;20:100-1.

Yacoub A, Lindahl P, Rubin K, Wendel M, Heinegard D, Ryden C. Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemical* 1994;222:919-925.

Valentine FCO. Further observations on the role of the toxin in staphylococcal infections *Lancet* 1936; i: 526-31.

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

Van der Vijver JC, Van Es-Boon M, Michel MF. Lysogenic conversion in *Staphylococcus aureus* to leucocidin production. *Journal of Virology* 1972;10:318-9.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9:978-984.

Van Duijkeren E, Wolfhagen MJHM, Heck MEOC, Wannet WJB. Transmission of a Panton–Valentine leucocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. *Journal Clinical Microbiology* 2005;43(12):6209-11.

Van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, Van Nes A, Vagenaar JA, Fluit AC. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Veterinary Microbiology* 2007;126: 383–9.

Van Loo IHM, Huijsdens X, Tiemersma E, Neeling A, Van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Klutmans J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infectious Diseases* 2007;13:1834-8.

Vangerhaeghan W, Cerpentier T, Adriaesen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary Microbiology* 2010;4743:6.

Voss A, Loeffen F, Bakker C, Klaassen C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Disease* 2005;11:1965-6.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, Deleo FR. Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *Journal Infectious Disease* 2006;194:1761-1770.

Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th. ed. Churchill Livingstone: 2000.

Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberg L, Becker AL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Veterinary Microbiology* 2008;127:171-8.

Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Tiemersma E, Willems RJ, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Etienne J. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3341-3345.

Ward PD, Turner WH. Identification of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infection and Immunity* 1980;27:393-397.

Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003;47(11):3574-9.

Witte W, Cuny C, Klare I, Nübel U, Strommenger B. Emergence and spread of antibiotic resistant Gram positive bacterial pathogens, [Electronic Journal]: 2008, *International Journal of Medical Microbiology*. Erişim:(www.sciencedirect.com). Erişim Tarihi: 12 Haziran 2011.

Witte W, Cuny C, Klare I, Nübel U, Strommenger B. Emergence and spread of antibiotic resistant Gram positive bacterial pathogens [Electronic Journal], *International Journal of Medical Microbiology* 2008 Erişim: www.sciencedirect.com Erişim Tarihi: 10.06.2010.

Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Pantone-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60:1258-1263

Woodin AM. Staphylococcal leucocidin. In: Cohen JO(Eds). *The staphylococci*. New York: Wiley-Interscience; 1972. p. 281-99.

Woodin AM. Purification of the two components of leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Journal* 1960;75:158-65.

Woodin AM. Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical of Journal* 1959;73:225-37.

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

Yıldız O, Kırdar S, Aktepe GO, Karabiber N, Öncü S, Tatman OM, Özyurt M, Şener AG, Coşkuner A, Çoban AY, Arslan U, Özkütük N, Bayramoğlu G, Güdücüoğlu H, Bozdoğan B. Molecular epidemiology of 397 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 hospitals in Turkey. 110th General Meeting American Society for Microbiology. 23-27 May 2010, San Diego Convention Center California, USA;2010.

Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, Abrams T, Dul M, Kim J, McGowan KL, Coffin SE. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection. 2001-2003. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2006;25:43-8.

Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 2006;40(4):177-183.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Chemother* 2009;53:531-40.

ÖZGEÇMİŞ

1970’de Mersin’de doğdu. İlköğretimi ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 1991’de Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden mezun oldu. 2004’te Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.D yüksek lisans, 2007’de Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.D yüksek lisansını tamamladı. 1992-1994 yıllarında Ege Köytür, 1995-1996 yıllarında Güney Tavukçuluk, 1996-1997 yıllarında İED-ALKE, 1998-2008 Çamlı Yem Besicilik’te çalıştı. 2008 yılından beri Mistral-Sanders’de çalışmaktadır. Evli ve 1 kız çocuk annesidir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana desteğini esirgemeyen danıŐmanım Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA' ya, sahip olduğu engin bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen ADÜ Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen ADÜ Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, materyel sağlamamda katkıları bulunan Uzm. Vet. Hek. Seyhan Kaynarca, Uzm. HemŐire Emel İnegöl' e ve koŐulsuz yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.