

***Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Panton-Valentin Lökosidin Varlığının Araştırılması**

Investigation of Panton-Valentine Leukocidin Presence in the Clinical Strains of Staphylococcus aureus

Osman Sezer Cirit¹, Tuba Yıldırım², Ahmet Yılmaz Çoban¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

²Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Amasya, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentin Lökosidin (PVL) varlığı PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada, Şubat 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 130 MRSA ve 20 MSSA izolati test edildi. *S. aureus* izolatları ile bu izolatlardaki metisilin direncinin doğrulanması multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapıldı. PVL gen varlığı hem multipleks PZR hem de single-target PZR ile de test edildi.

Bulgular: Çalışma sonucunda, 3 izolatta PVL pozitif bulundu. Bunlardan ikisi MRSA, diğeri ise MSSA izolatı idi. PVL pozitif MRSA izolatının biri yara örneğinden diğeri kan kültür örnejinden tanımlandı. PVL pozitif MSSA izolatı ise idrar örnejinden tanımlandı. PVL pozitif izolatların üçü de tetrراسikline dirençliydi. Kan kültüründen izole edilen PVL pozitif MRSA izolatı gentamisin ve siprofloksasine de dirençli bulunurken, diğer PVL pozitif MRSA izolatı duyarlı bulundu.

Sonuç: Toplumda ve hastanede PVL pozitif izolatların yayılmasını engellemek ve PVL pozitif izolatların prevalansı ve genetik özellikleri hakkında bilgi edinebilmek için ileri çalışmaları ihtiyaçlıdır.

Anahtar Sözcükler: *Staphylococcus aureus*, metisilin, PVL

Geliş tarihi: 24.04.2009

Kabul tarihi: 13.07.2009

ABSTRACT

Objective: In this study, the presence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) was investigated in the *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR.

Material and Methods: In this study, 130 MRSA and 20 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates were tested among various clinical samples between February 2006 and June 2008. Confirmation of *S. aureus* isolates and the methicillin resistance of these isolates were made by multiplex PCR. The presence of PVL was tested by both multiplex PCR and single target PCR.

Results: The presence of PVL was determined in 3 isolates. Two of the isolates were from MRSA isolates, one was from MSSA isolates. One of the PVL positive MRSA isolate was recovered from a wound specimen, the other was from blood culture. PVL positive MSSA isolate was recovered from an urine specimen. All of the three PVL positive isolates were resistant to tetracycline. One of the PVL positive MRSA isolates which was recovered from blood culture was resistant to gentamicin and ciprofloxacin, while the other PVL positive isolate was susceptible.

Conclusion: Further studies are needed to determine the prevalence and genetic characteristics of PVL positive isolates and to prevent dissemination of PVL positive isolates both in the hospital environment and the community.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, methicilline, PVL

Received: 24.04.2009

Accepted: 13.07.2009

Giriş

Staphylococcus aureus foliklit ve fronkül gibi deri infeksiyonlarından, selülit, abse, osteomiyelit, pnömoni, sepsis ve endokardit gibi derin yerleşimli ve hayatı tehdit edici durumlara yol açabilen birçok hastalık neden olabilmektedir (1).

Metisilinin 1960'lı yılların başında kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'lar ortaya çıkmıştır (2). MRSA 1990'lı yıllara kadar sadece hastane infeksiyonlarından sorumlu iken, daha sonraları hastane veya hastane personeliyle ilişkisi olmayan ve herhangi bir risk faktörü bulunmayan hastane dışı kişilerde de tüm dünyada izole edilmeye başlanmıştır (3). Son yıllarda Toplum kaynaklı MRSA

(TK-MRSA) infeksiyonları düzenli artış göstererek önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya başlamıştır (4). Bu mikroorganizmayı ve sebep olduğu infeksiyonları tanımlayabilmek için oldukça fazla sayıda çalışma bulunmakla beraber TK-MRSA'yı tanımlamada kullanılan terminolojide henüz tam bir fikir birliğine varılmıştır. Bu konudaki anlaşmazlık, yeni ortaya çıkan TK-MRSA'nın hastanelerde yayılımıyla doruğa ulaşmıştır (5).

TK-MRSA'nın sağlık kuruluşlarındaki yayımı yeni ortaya çıkan bir problemdir ve yakın zamandaki salgınlarla ilgili raporlar erken tanının ve acil kontrol önlemlerinin önemini vurgulamaktadır. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin birçok eyaletinde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilen MRSA oranı %50'lerin üzerine çıkmıştır. Daha da

endişe verici olanı TK-MRSA'ların ilaçlara direnç oranlarının artması, yeni coğrafi alanlarda ve popülasyonlarda yayılmasıdır. Göçler ve yabancı ülkelere seyahat muhtemelen Avrupa'daki yayılımın hızında anahtar rol oynamaktadır (6).

Ciddi TK-MRSA infeksiyonlarında ve buna bağlı ölümlerdeki hızlı artış bu potansiyel virulan patojenin yayılımının kontrolünde Panton-Valentin Lökositin (PVL) geni taşıyan *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasının önemini işaret etmektedir. MRSA izolatlarında PVL geninin saptanması, bu izolatların TK-MRSA olabileceğini düşündürmektedir. Bazı toplum kaynaklı *S. aureus* izolatları *mecA* genini taşımalarına rağmen metisilin Minimum İnhibitor Konsantrasyon (MİK) değerleri çok düşük olabilmektedir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde bunlar yanlışlıkla metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle PVL üreten MSSA izolatlarında *mecA* geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmesi önerilmektedir (7).

Bazı hastane başlangıçlı MRSA infeksiyonları toplum kaynaklı organizmalardan kaynaklanabilir ve bazı toplum başlangıçlı MRSA infeksiyonları da hastane kaynaklı organizmalardan kaynaklanabilir (8). Mikrobiyolojik ve moleküler veriler olmaksızın sadece epidemiyolojik bilgiye dayalı CDC kriterleri tek başına TK-MRSA'yı tanımlamada yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı klinik, epidemiyolojik ve mikrobiyolojik bilginin sentezi TK-MRSA'nın tanımlanmasında kullanılmalıdır (5). Bu nedenle de çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA izolatları toplum ve hastane kaynaklı izolatlar olarak sınıflandırılamayıp yatan ve ayaktan hasta izolatları olarak sınıflandırılmış ve bu izolatlarda metisilin direncine yol açan *mecA* geni ile PVL S/F'yi kodlayan *lukS/F-PV* geninin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntemler

Bakteri izolatları: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıp Laboratuvarları Mikrobiyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı'na, Şubat 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA'lardan belirli periyotlarda seçilen 130 (%86.7) MRSA ve 20 (%13.3) MSSA olmak üzere toplam 150 *S. aureus* izolatı çalışmaya dahil edildi. Ayrıca *mecA* pozitif *S. aureus* ATCC 43300 suçu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Izolatların antibiyotik duyarlılığı VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle AST P536 kartı kullanılarak belirlendi. İzolatların metisilin direnci VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle belirlenmiş ve multipleks PZR'de *mecA* geni tespit edilerek doğrulanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu: *S. aureus* bakteri hücrelerinden DNA eldesi fenol-kloroform yöntemi ile yapıldı (9). Mueller Hinton Agar (MHA) üzerinde 24 saatlik saf kültür halinde üretilmiş yaklaşık 25-30 koloni alınarak 2 ml Tris HCl-EDTA (TE) pH:8 tamponu ile süspansedildi ve 30 saniye vortekslendi. 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 0.2 ml TE tamponu ve 0.2 ml Proteinaz K solüsyonu eklendi. 50°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Solüsyona 2 ml TE tamponu eklenderek karıştırlındı. Karışımın 0.4 ml'si 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 0.4 ml fenol konularak vortekslendi ve 11.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 0.4 ml kloroform eklendip vortekslendi ve

11.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine toplanan sıvı hacminin 1/10'u kadar 3M sodyum asetat ve iki katı kadar absolu alkol eklendirip karıştırlındı. Karışım -20°C'de 30-60 dakika soğutuldu. 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve üst kısım atıldı. DNA pelleti üzerine 1 ml soğuk %70'lük ethanol eklenderek 14.000 g'de santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. DNA pelleti oda ısısında kurutulup üzerine 50 µl TE tamponu eklenderek homojenize edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (9).

Multipleks PZR Yöntemiyle *Staphylococcus* Cins Spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* Gen Bölgelerinin Belirlenmesi: *S. aureus* izolatlarından elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle, Tablo 1'de gösterilen McClure ve arkadaşları (10) tarafından tanımlanmış olan 756-bp (*Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA), 433-bp (*lukS/F-PV*), 310-bp (*mecA*) genlerine özgü primerler kullanılarak bu gen bölgeleri amplifiye edildi.

2.5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl), 3 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 2 mM dNTP Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2 pmol primer stoklarından, 0.875 µl Staph756F ve Staph750R, 1 µl Luk-PV-1 ve Luk-PV-2, 3 µl *mecA*-1 ve *mecA*-2 primer (ThermoHybaid, Ulm, Germany), 0.2 µl (5U/µl) Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2.05 µl saf su ve 5 µl 50 ng kalıp DNA eklenderek toplam 25 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. MultiBlock PCR System (Thermo, CA, USA) kullanılarak DNA amplifikasiyon işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına başlangıçta 94°C'de 10 dakika ve her bir döngü için 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 55°C'de 45 saniye primer bağlanması, 72°C'de 75 saniye primer uzaması basamaklarını içeren 10 döngü, 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 50°C'de 45 saniye primer bağlanması, 72°C'de 75 saniye primer uzaması basamaklarını içeren 25 döngü ve 72°C'de 10 dakika son uzama basamakları uygulandı.

***lukS/F-PV* gen bölgesinin single-target PZR yöntemi ile belirlenmesi:** Lina ve arkadaşları (11) tarafından tanımlanan

Tablo 1. *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* primer dizileri (McClure ve ark., 2006)

Primer adı	Primer dizisi
<i>Staphylococcus</i> cins spesifik	
16S rRNA ya özgü primerler	
Staph756F	5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3'
Staph750R	5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3'
<i>lukS/F-PV</i>'ye özgü primerler	
Luk-PV-1	5'- ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3'
Luk-PV-2	5'-GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3'
<i>mecA</i>'ya özgü primerler	
<i>mecA</i> 1	5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'
<i>mecA</i> 2	5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3'

Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primerleri kullanılarak 433 bp (*lukS/F-PV*) gen bölgesi amplifiye edildi. 4 μ l 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl) 4 μ l 25 mM MgCl₂, 3 μ l 1.25 mM dNTP Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2 μ l 5 pmol Luk-PV-1 ve Luk-PV-2 primer (ThermoHybaid, Ulm, Germany), 0.3 μ l (5U/ μ l) Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 20 μ l saf su ve 5 μ l 50 ng kalıp DNA eklenererek toplam 40.3 μ l reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına başlangıçta 94°C'de 5 dakika ve her bir döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanması, 72°C'de 60 saniye primer uzaması basamaklarını içeren 30 döngü, 72°C'de 7 dakika son uzama basamakları uygulanarak DNA amplifiye edildi.

SCCmec tiplendirme: Oliveira ve de Lancastre'nin (12) önerdiği yöntemle PVL pozitif bulunan 2 MRSA izolatına SCCmec tiplendirmesi yapılmıştır. Tiplendirmede CIF2 F2, CIF2 R2, KDP F1, KDP R1, MECI P2, MECI P3, DCS F2, DCS R1, RIF4 F3, RIF4 R9, RIF5 F10, RIF5 R13, IS431 P4, pUB110 R1, IS431 P4, pT181 R1 ile internal kontrol olarak MECA P4 ve MECA P7 primerleri kullanılarak multipleks PZR yapıldı.

Jel Elektroforezi: PZR ürünleri %2 agaroz içeren 1X TBE tamponu ile hazırlanan jеле yüklenidi ve 5 μ g/ml etidyum bromid ile jel boyandı. DNA bandları "GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus" belirteçleri ile karşılaştırılmış olarak görüntüleme cihazında incelendi.

Bulgular

Hastanemizde izole ettiğimiz *S. aureus*'ların yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerin dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen *S. aureus* izolatlarının materyallere göre dağılımı incelendiğinde, en sık izole edildiği materyal %21.3 ile yara kültür olup bunu %20.6 ile trakeal aspirat kültür, %18.6 ile kan kültür örnekleri izlemektedir. Gönderilen klinik örneklerin servislere ve polikliniklere göre dağılımı Tablo 3'de sunulmuştur. Laboratuvarımıza materyallerin çoğunluğu Dahiliye ve Beyin Cerrahisi Servisleri'nden gönderilmiş ve bunu Pediatri Servisi izlemiştir.

MecA1 ve MecA2, Luk-PV-1 ve Luk-PV-2, Staph756F ve Staph750R primerleri kullanılarak multipleks PZR yöntemiyle, *S. aureus* izolatlarında *mecA* geniyle birlikte *lukS/F-PVL* geninin varlığı araştırıldı (Şekil 1). 150 adet *S. aureus* izolatı arasında *mecA* geni (310 bp) bulunma oranı %86.6 olarak tespit

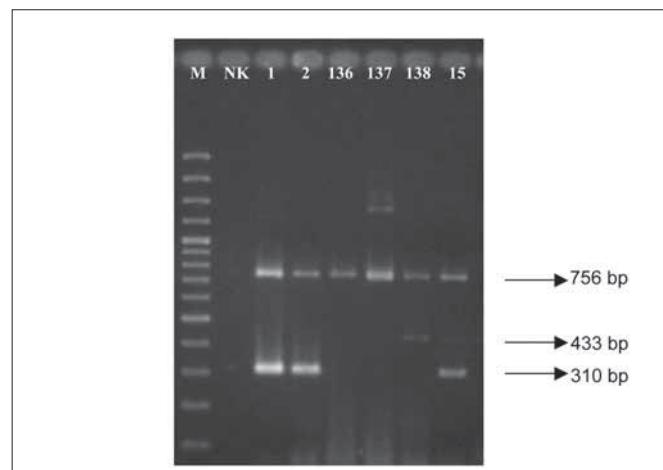
Tablo 2. *S. aureus*'ların izole edildiği klinik örnek türleri

Klinik örnek	Sayı	%	Klinik örnek	Sayı	%
Yara	32	21.3	Abse	3	2
Trakeal aspirat	31	20.6	Diyalizat	3	2
Kan	30	20	Katater	3	2
Balgam	17	11.3	Ameliyat materyali	2	1.3
Akıntı	9	6	Burun sürüntüsü	2	1.3
Konjunktiva sürüntüsü	5	3.4	Eklem sıvısı	1	0.7
BOS	6	4	Plevral sıvı	1	0.7
İdrar	4	2.7	Mayi	1	0.7

Tablo 3. Gönderilen materyallerin böülümlere göre dağılımı

Bölümler	Sayı	%
Dahiliye servisi	18	12
Beyin cerrahisi servisi	18	12
Pediatri servisi	12	8
Acil servis	10	6.6
Göğüs hastalıkları servisi	9	6
Ortopedi servisi	9	6
Yoğun bakım ünitesi	9	6
Genel cerrahi servisi	6	4
Kardiyoloji servisi	6	4
İnfeksiyon servisi	5	3.4
İnfeksiyon polikliniği	5	3.4
Plastik cerrahi servisi	5	3.4
Yeni doğan servisi	4	2.7
Göğüs cerrahisi	4	2.7
Nefroloji polikliniği	4	2.7
Kadın doğum servisi	3	2
Kulak burun boğaz servisi	3	2
Nöroloji servisi	3	2
Kardiyovasküler cerrahi servisi	2	1.3
Göz hastalıkları servisi	2	1.3
Ortopedi polikliniği	2	1.3
Dermatoloji servisi	2	1.3
Pediatri polikliniği	2	1.3
Diğer *	7	4.6

*Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği, Göğüs Cerrahisi Polikliniği, Göğüs Hastalıkları Polikliniği, Kadın Doğum Polikliniği, Pediatric Yoğun Bakım, Uroloji Servisi ve Koroner Yoğun Bakım



Şekil 1. *S. aureus* izolatlarında, saptanan *Staphylococcus* cins spesifik 16S rRNA, *lukS/F-PV* ve *mecA* gen bölgeleri için saptanan sırasıyla 756, 433, 310 bp'lik bant profilleri (M: Marker NK: Negatif kontrol, 1-2: PVL(-) MRSA, 136-137: PVL (-) MSSA, 138: PVL (+) MSSA, 15: PVL (+) MRSA)

edilirken, *lukS/F-PV* geni (433 bp) bulunma oranı %2 olarak tespit edildi.

Çalışmada ayrıca *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri kullanılarak da PZR yöntemiyle *S. aureus* izolatlarında *lukS/F-PV* geninin varlığı araştırıldı. Burada da multipleks PZR'de elde edilen sonuçların ayını saptandı. PVL pozitif izolatların PZR bant görsüntüleri de Şekil 2'de sunulmuştur. Çalışmamızda *lukS/F-PV* geni tespit edilen 3 izolatın 2'si MRSA, 1'i ise MSSA izolatı idi.

MRSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatların elde edildiği örneklerden 1'i Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan örneği, diğeri ise Plastik Cerrahi Servisi'nden gönderilen yara örneğiydi. MSSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatın elde edildiği materyal Kardiyoloji Servisi'nden gönderilen idrar örneğiydi. PVL pozitif izolatların 3'ü de tetrasikline dirençli iken, kan kültüründen elde edilen izolat ise tetrasiklinin yanı sıra gentamisine ve siprofloksasine de dirençli bulunmuştur.

Çalışmada ayrıca VITEK 2 ile elde edilen metisilin dirençli ve duyarlı izolatların PZR ile elde edilen sonuçları tamamen uyumlu olarak saptandı. *lukS/F-PV* geni tespit edilen 3 izolatın MRSA olan 2 izolatın SCCmec tiplendirme sonucunda her 2 izolat da SCCmec tip IV olarak tespit edilmiştir (Şekil 3).

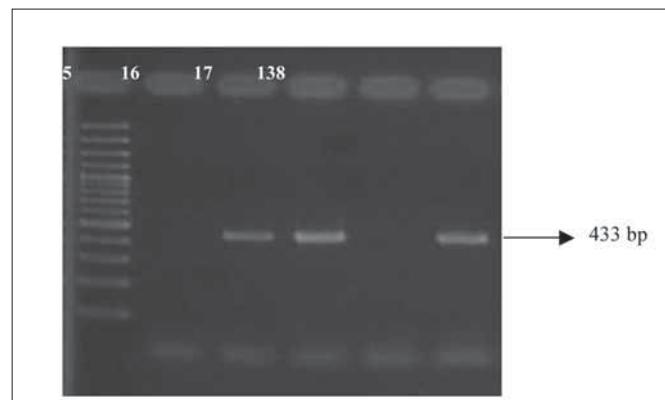
Tartışma

MRSA'lara bağlı endokardit, pnömoni ve bakteriyemi gibi ciddi infeksiyonlar hastanelerde daha yaygın görülmektedir. Belki daha da önemlisi MRSA infeksiyonlarının günümüzde daha önceden sağlıklı ve hastaneden geçişin olmadığı bireyler arasında da yerini almaya başlamış olmasıdır. Böyleslikle çocuklar, adolestanlar, atletler gibi birçok farklı topluluklarda bulunan, sıkılıkla deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla kendini gösteren MRSA infeksiyonları toplum kaynaklı diye isimlendirilmiştir. HK-MRSA izolatlarıyla karşılaşıldıklarında TK-MRSA izolatları ayırt edici genetik profile sahiptir (13).

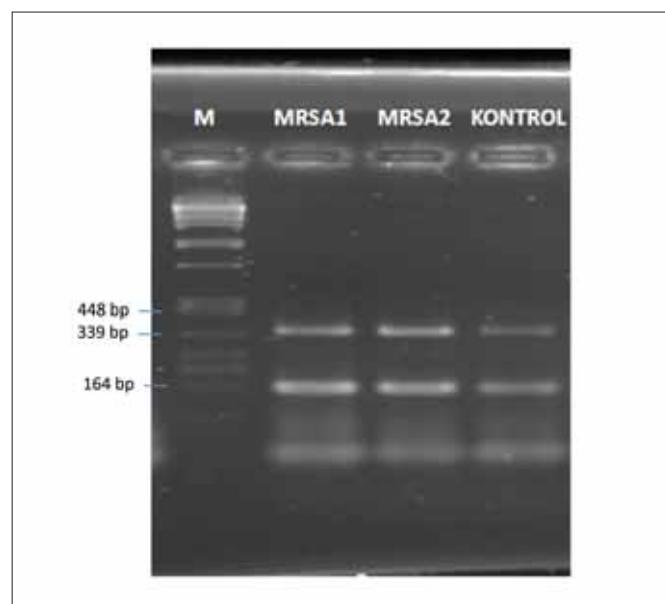
S. aureus'da PVL varlığı hastalık şiddetine artışla birlikte cerrahi drenaja ihtiyaç gösteren deri infeksiyonundan, ağır kronik osteomiyelite ve ölümçül nekrotizan pnömoniye kadar değişen olgularla ilişkilidir. Belki de PVL virulans faktörünün görünülenmesi gelecekte rutin laboratuvar işlemleri arasında girecektir (10).

Ciddi TK-MRSA infeksiyonlarının prevalansında ve dünyanın her tarafından raporlanan ölümlerde hızlı artış, bu potansiyel virulan patojenin kontrolünde PVL taşıyan *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasında basit ve hızlı bir metodun önemini işaret etmektedir. Çalışmada kullandığımız konvansiyonel multipleks PZR yöntemi eş zamanlı olarak metisilin direnç genini ve PVL genini tanımlayabilmekte, bu yöntem uygulanmadan önce izolatlar fenotipik olarak *S. aureus* olarak tanımlanırsa MRSA ile MSSA ayırmına izin verebilmektedir. Multipleks PZR yöntemi, 2004 yılında Kanada Calgary'de TK-MRSA infeksiyon salgınlarının ortaya çıkışının tanımlanması ve doğrulanmasında kullanılmıştır (10). Vandenesch ve arkadaşları (14) üç kitadan 117 TK-MRSA izolatının incelenmesi sonucunda tip IV SCCmec kaset gen ve PVL gen bölgelerinin üç kitadan toplanan TK-MRSA izolatlarında paylaşıldığını saptamışlardır.

Metisiline direnç oranlarındaki artış önceleri yavaşken 1990'ların sonlarına doğru gelindiğinde bu oranlarda dramatik bir artış olmuştur. Bu artış TK-MRSA'ların görülmeye başlan-



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarında saptanan 433 bp'lik *lukS/F-PV* gen bölgeleri (M: Marker, NK: Negatif kontrol, 15-16: PVL (+) MRSA, 17 PVL (-) MRSA, 138 PVL (+) MSSA)



Şekil 3. MRSA izolatlarının SCC tiplendirmesi için multiplex PCR sonucu (Kontrol olarak Dr. Bülent Bozdoğan'ın koleksiyonundan *S. aureus* TR2 suzu kullanılmıştır. Marker olarak lambda DNA'sı PstI enzimi ile kesildikten sonra kullanılmıştır)

masıyla aynı zamana denk gelmiştir. Birçok bölgede TK-MRSA izolatları MSSA'dan daha yaygın olmaya başlamıştır (15).

TK-MRSA'ların orjinlerini açıklamak için kabul edilen güncel model; farklı coğrafi bölgelerde dolaşan birçok farklı MSSA klonunun genomuna küçük metisilin direnç kasedinin (örneğin SCCmec tip IV) bağımsız olarak entegre olmasıdır. PVL pozitif TK-MRSA'nın ortaya çıkışıyla ilgili modelde ilk olarak PVL'yi kodlayan *lukS-PV* ve *lukF-PV* taşıyan faj MSSA'yı infekte ve lizojenize etmektedir. Daha sonra *mecA* geni taşıyan metisilin direnç kasedi (SCCmec IV, V) horizontal olarak PVL-pozitif MSSA izolatlarına transfer olarak fajın integre olduğu alandan ayrı bir lokalizasyonda genoma integre olmaktadır (15).

PVL ve TK-MRSA arasındaki güçlü epidemiyolojik bağlantı hastalık esnasında ve patogenezde PVL'nin önemli bir rol oynamasıyla ilgili şüpheleri ortadan kaldırılmıştır. Bununla birlikte PVL'nin patogenezde kesin rolü tam olarak açıklanamamak-

tadır. Son kanıtlar, PVL'nin PMNL'ler ve/veya monositlerdeki yıkım ve inflamasyonu indüklemesine ek olarak diğer virulans faktörlerinin ekspresyonunu artırtarak dolaylı olarak da virulansın artmasına katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Moleküler epidemiyolojinin ve ek olarak izogenik PVL-pozitif ve negatif bakteriyel izolatların hayvan infeksiyon modellerinde kullanıldığı çalışmaların izlenmesiyle patogenez daha net anlaşılabilecektir (14, 16).

Lina ve arkadaşları (11) tarafından 172 *S. aureus* izolatı PVL geninin görüntülenmesi için PZR yöntemi ile incelenmiştir. PVL geni frökküle ilişkili izolatların %93'ünde, hepsi toplum kaynaklı ağır nekrotizan pnömoniyle ilişkili izolatların %85'inde saptanmıştır. Çalışmada, PVL'nin esas olarak deri ya da mukozayı içeren nekrotik lezyonlarla ve toplum kaynaklı pnömoniyle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Holmes ve arkadaşları (17) 2002 yılında İngiltere ve Galler'de *S. aureus* izolatlarında PVL gen sikliğini araştırmak için yaptıkları çalışmada, seçilen 515 izolattan 8 (%1.6)'inde PVL gen varlığını pozitif bulmuşlardır. PVL geninin stafilocokal hastalıklarda dağılımını saptamak için seçilen 470 izolattan 23 (%4.9)'ünde PVL'yi pozitif bulmuşlardır. Pozitif olan 23 izolatin 15 (%65)'ini deri ve yumuşak doku örneklerinden elde edilen izolatlar oluşturmuştur. Kalan izolatlardan 4'ü pnömonili olgulardan, 2'si yanık infeksiyonlarından, 1'er tanesi de bakteriyemili ve soyulmuş deri sendromlu hastalardan elde edilmiştir.

Hong Kong Halk Sağlığı Laboratuvar'ında TK-MRSA olduğu varsayılan 140 izolat 2006 yılı süresince incelendiğinde, 42 (%30) izolatin PVL geni taşıdığını saptanmıştır. Bunların arasında SCCmec tip IV %71.4 ve SCCmec tip V %28.6 oranında bulunmaktadır. PVL pozitif MRSA izolatlarının %88.1'i deri ve yumuşak doku örnekleri, %7.1'i kan kültürü, %2.4'u eklem aspiratı ve %2.4'u göz örneklerinden elde edilmiştir (4).

Krziwanek ve arkadaşları (18) 2001-2006 yılları arasında Avusturya'da, 1150 MRSA izolatında PVL gen varlığını incelemişler ve 94 PVL pozitif izolat tanımlamışlardır. Bunların %10.6'sı steril vücut sıvılarından, %84.1'i steril olmayan alanlardan elde edilmiştir. Otter ve arkadaşları (19) 2000-2006 yılları arasında toplanan 194 siprofloksasin duyarlı MRSA izolatında PVL oranını %25.3 olarak saptamışlardır. Jones ve arkadaşları (20) 2005 yılında komplike olmayan deri ve derinin yapısal infeksiyonlarından izole edilen 190 *S. aureus* izolatını incelemiştir. 101 MRSA izolatından 77'si TK-MRSA olarak kabul edilmiş ve bu toplum kaynaklı izolatlarda PVL pozitiflik oranı %95 oranında saptanırken 89 MSSA izolatında ise %17 oranında saptanmıştır.

Cercenado ve arkadaşları (21) İspanya'da yaptıkları araştırmada, 3 yıllık süreçte Acil Servis'e başvuran hastalardan üçten fazla antibiyotik grubuna dirençli olarak buldukları MRSA'ları çalışma kapsamına almışlardır. 53 MRSA izolatının 13'ünde (%24) PVL toksin varlığını saptamışlardır. Tüm PVL pozitif MRSA izolatlarının toplum kaynaklı olduğunu belirlemiştirlerdir. Izolatların 5'i tetrasiklin ve doksisikline dirençliken bir tane-si fusidik aside dirençli bulunmuştur. Izolatların 11'i piyojenik deri ve yumuşak doku infeksiyonlarıyla ilişkili bulunmuştur. PVL pozitif 9 hastanın Güney Amerika'dan olması PVL pozitif TK-MRSA'nın kıtalar arası yayılımına dikkat çekmektedir.

Denis ve arkadaşları (22) 2002-2004 yılları arasında Belçika'lı hastalardan topladıkları 41 klinik MRSA izolatının 16'sının (%40)

PVL toksin geni taşıdığını bulmuşlardır. PVL toksin geni pozitif bulunan izolatların biri dışında hepsi toplumdan kazanılmıştır. Japonya'da 1979-1985 yılları arasında izole edilen 97 MRSA izolatinin 44'ünde (%45.3) PVL pozitifliği saptanmıştır (23). Kanada Calgary'de 1999-2003 yılları arasında toplanan izolatlar-dan seçilen 287 MRSA ve 280 MSSA izolatında PVL pozitiflik oranları sırasıyla %1.9 ve %2.1 olarak bulunmuştur (10).

Toplum kaynaklı MRSA izolatlarının varlığı SCCmec tipi, PVL saptanması ve MLST analizinin birlikte değerlendirildiği çalışmalar ile gösterilebilir ve (7) Türkiye'den yapılan bir çalışmada Kılıç ve arkadaşları (24) 4 yıllık dönemde 385 MRSA izolatını incelemiştir ve 5 (%1.3) izolatta PVL pozitifliği bulmuşlardır. Özkuş ve arkadaşları (25) 79 MSSA izolatının 6'sında PVL'yi pozitif bulmuşlar ve 55 MRSA izolatının hiçbirinde PVL geni pozitif bulamamışlardır. Karahan ve arkadaşları (26) 261'i MRSA (230'u hastane kaynaklı, 74'u toplum başlangıcı), 43'ü MSSA olmak üzere toplam 304 *S. aureus* izolatının 12'sinde (1'i hastane kaynaklı, 11'i toplum kaynaklı) PVL pozitifliği saptamışlardır. PVL pozitif izolatların 8'i MRSA, 4'ü ise MSSA'dır. PVL pozitif izolatların 7'si yara örneklerinden, 4'ü idrar örnekinden, 1'i ise sinoviyal sıvıdan izole edilmiştir. Yaptığımız çalışmada kullanılan 130 MRSA izolatının 2'sinde, 20 MSSA izolatının ise 1'inde PVL gen pozitifliği saptandı. MRSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatların elde edildiği örneklerden 1'i Dahiliye Servisi'nden gönderilen kan örneği, diğeri ise Plastik Cerrahi Servisi'nden gönderilen yara örneği idi. MSSA'lar arasında PVL geni saptanan izolatın tanımlandığı örnek ise Kardiyoloji Servisi'nden gönderilen idrardı. PVL pozitif izolatların 3'ü de tetrasikline dirençli bulunmuştur. MRSA'lar arasında PVL geni saptanan Da-hiliye Servisi'nden gönderilen kan izolati, tetrasiklinin yanı sıra gentamisine ve siprofloksasine de dirençli bulunmuştur.

Genomik ve antibiyogram farklılıklarının yanı sıra TK-MRSA izolatlarının hemen hemen hepsi PVL virulans genleri taşımaktadır. HK-MRSA'lar yaygın olarak tip I, II, III gibi daha büyük, 34-67 kb uzunluğunda SCCmec kaset gen tipleri taşımaktadır. TK-MRSA'lar ise diğer *S. aureus* izolatlarına daha kolay transfer edilebilen ve *mecA* genine sahip yeni, küçük, hareketli bir SCCmec tip IV ya da tip V genetik elemanını taşımaktadır (3-10). Kılıç ve arkadaşlarının (24) çalışmada SCCmec kaset gen tip IV/V taşıyan izolatların deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edildiği görülmüştür. PVL geninin ise SCCmec kaset gen tip IV/V taşıyan izolatların %10'unda, SCCmec kaset gen tip I/II/III taşıyan izolatların ise %0.3'ünde pozitif olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada PVL geni pozitif bulduğumuz her iki MRSA izolatında SCCmec kaset gen tipi, tip IV olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, PVL pozitif MRSA epidemiyolojisini daha iyi anlayabilmek için yeterli risk faktör analizlerinin yapıldığı popülasyon bazlı çalışmaların yanı sıra hasta bazlı çalışmalar da ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Çalışmada PVL pozitif saptanan 3 izolatdan MRSA olan 2 izolata SCCmec tiplendirme yaptığı için sayın Doç. Dr. Bülent Bozdoğan'a teşekkür ediyoruz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), pp.: 2321-51. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, et al. Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of Panton-Valentine Leukocidin Toxin Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43:6147-9.
3. Kılıç A. Metisiline Direçli *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanışsal Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Bildiri Özeti Kitabı. 2008 Ankara.
4. Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Tsang VY, Lo JY. Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Hong Kong. *J Med Microbiol* 2008;57:1440-3.
5. Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect* 2007;67:109-13.
6. Navarro MB, Huttner B, Harbarth S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in the 21st century: beyond the acute care hospital. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:372-9.
7. Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç Ve Epidemiyoloji. *ANKEM Derg* 2008;22:276-86.
8. Gerberding JL, Chambers HF. Community-Onset Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Scheld WM, Craig WA, Hughes JM. Emerging Infections 5. ASM Press. Washington, D.C 2001;85-93.
9. Durmaz R, Ayan M. *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde 'Arbitrarily Primed' PZR ve 'Pulsed -Field Gel' Elektroforezi. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001;219-28. Ankara.
10. McClure JA, Conly JM, Lau V, et al. Multiplex PCR Assay for Detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin Genes and Simultaneous Discrimination of Methicillin-Susceptible from -Resistant Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006;44:1141-4.
11. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128-32.
12. Oliveira DC and de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2155-61.
13. Karchmer AW, Bayer AS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Clinical Challenge. *Clin Infect Dis* 2008;46:342-3.
14. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978-84.
15. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation* 2007;87:3-9.
16. Wardenburg JB, Bae T, Otto M, DeLeo FR, Schneewind O. Poring over pores: α -hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nature Medicine* 2007;13:1405-6.
17. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* Isolates Carrying Panton-Valentine Leucocidin Genes in England and Wales: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:2384-90.
18. Krizwanek K, Luger C, Sammer B, et al. PVL-positive MRSA in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:931-5.
19. Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:670-6.
20. Jones RN, Nilius AM, Akinlade BK, Deshpande LM, Notario GF. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from a 2005 Clinical Trial of Uncomplicated Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:3381-4.
21. Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:143-9.
22. Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, et al. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1103-6.
23. Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K. Molecular epidemiology of Japanese hospital MRSA 1979-85.-Predominance of Panton-Valentine leukocidin positive clones. *J Clin Microbiol* 2006;44:4515-27.
24. Kılıç A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008;94:607-14.
25. Ozkul H, Oktem IM, Gulay Z. Investigation of the presence of panton-valentin leukocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:357-62.
26. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine Leukocidin Genes and SCCmec Types in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2008;14:203-10.