

Hastane ve Toplum Kaynaklı *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Araştırılması*

Investigation of Various Virulence Factors Among the Hospital and Community-Acquired *Staphylococcus aureus* Isolates by Real-Time PCR Method

Soner YILMAZ¹, Abdullah KILIÇ¹, Alper KARAGÖZ², Orhan BEDİR¹,
Aylin ÜSKÜDAR GÜÇLÜ¹, Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gulhane Military Academy of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

² Public Health Institution of Turkey, Molecular Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, GATA Araştırma Bilimsel Kurulunun kabul ettiği 13 Kasım 2009 tarih ve AR-2009/57 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 31.01.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.06.2012

ÖZET

Staphylococcus aureus, toplumda görülen deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden biri ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli nedenidir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplum ve hastane kaynaklı *S.aureus* izolatlarında stafilokokal enterotoksin A-D (sırasıyla SEA, SEB, SEC ve SED), toksik şok sendromu toksin-1 (TŞST-1), Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksinleri ile SCCmec fenotiplerinin [metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatlarında] tespit edilmesi ve hastane ve toplum kaynaklı izolatlar arasındaki genotipik ilişkinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2007-2010 yılları arasında farklı klinik örneklerden izole edilen 147 *S.aureus* suşuna ait virülans faktörleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır. Hastane ve toplum kaynaklı izolatlar arasındaki genotipik ilişki MLVA (multiple locus variable number of tandem repeat analysis) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 147 *S.aureus* izolatının 72 (%48.9)'si hastane kaynaklı, 75 (%51.1)'i toplum kaynaklı olarak tanımlanmıştır. İzolatlardan 93 (%63.2)'ü en az bir adet (77 izolatta bir adet, 16 izolatta birden fazla) toksine sahiptir. Toksin tespit edilen izolatların %59.1 (55/93)'i hastane kaynaklı, %40.9 (38/93)'u ise toplum kaynaklı-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Soner Yılmaz, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06018 Etlik, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 304 4902, **E-posta (E-mail):** soyilmaz@gata.edu.tr

dır. İzolatların 59 (%40.1)'unda SEA, 8 (%5.4)'inde SEB, 12 (%8.1)'sinde SEC, 8 (%5.4)'inde SED, 17 (%11.5)'sinde TSST-1 ve 6 (%4.0)'sında PVL tespit edilmiştir. Metisilin direnci hastane kaynaklı izolatların %61.1 (44/72)'inde, toplum kaynaklı izolatların %6.7 (5/75)'sinde saptanmıştır. Çalışmamızda hastane kaynaklı MRSA suşlarında %90.9 (40/44) oranında SCCmec tip III, toplum kaynaklı MRSA suşlarında %40 (2/5) oranında SCCmec tip IV varlığı bulunmuştur. SEA tespit edilen izolatların çoğunun (40/47, %85.1) hastane kaynaklı olup metisiline dirençli oldukları belirlenmiştir. MLVA yöntemine göre hastane ve toplum kaynaklı grupların kümeleşme oranları, klon sayıları, özgün profil sayıları sırasıyla %73.6 ve %57.3, %34 ve %47, %19 ve %32 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, hastane kaynaklı MRSA izolatlarında yüksek oranda SEA tespit edilmesi, bu toksin ile antibiyotik direnç gelişimi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; virülans faktörleri; MLVA tiplendirme.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most common cause of skin and soft tissue infections in the community and the most important cause of nosocomial infections. In this research, it was aimed to detect the presence of staphylococcal enterotoxin A to D (SEA, SEB, SEC and SED, respectively), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), Pantón-Valentine leukocidin (PVL) and SCCmec phenotype in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates and to demonstrate the genotypic association between hospital acquired and community acquired isolates. In the study the virulence factors of 147 *S. aureus* strains isolated from various clinical samples at Gulhane Military Medical Academy Hospital Microbiology Laboratory between 2007 and 2010 were investigated by real-time polymerase chain reaction. MLVA (multiple locus variable number of tandem repeat analysis) method was used to demonstrate the genotypic association between hospital- and community-acquired isolates. Seventy-two (%48.9) of 147 *S. aureus* isolates were determined as community acquired and 75 (%51.1) as hospital acquired. Ninety-three (63.2%) isolates possessed at least one toxin (77 strains harboured one, and 16 strains harboured more than one). Of the isolates in which toxin was detected 59.1% (55/93) were hospital acquired, 40.9% (38/93) were community acquired. SEA was determined in 59 (40.1%), SEB in 8 (5.4%), SEC in 12 (8.1%), SED in 8 (5.4%), TSST-1 in 17 (11.5%) and PVL in 6 (4.0%) of the isolates. Methicillin resistance was determined in 61.1% (44/72) of the hospital acquired isolates and 6.7% of the (5/75) community acquired isolates. In our study, SCCmec type III was detected in 90.9% (40/44) of hospital acquired MRSA isolates and SCCmec type IV in 40.0% (2/5) of community acquired MRSA isolates. Most of the strains (40/47; 85.1%) carrying SEA were hospital acquired, and they were determined as methicillin-resistant. According to MLVA, hospital and community acquired groups' clustering rates, number of clones, number of unique profile were determined as; 73.6% and 57.3%; 34% and 47%; 19% and 32%, respectively. It was concluded that high prevalence of SEA toxin in hospital acquired MRSA isolates indicated that there was a possible association between the presence of toxin and antimicrobial resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*; virulence factors; MLVA typing.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biri olup, hastane kaynaklı pnömoni ve cerrahi yara enfeksiyonlarının en sık; kan akımı, kardiyovasküler, göz, kulak, burun ve boğaz enfeksiyonlarının ikinci sıklıkla nedenidir^{1,2}. Bu enfeksiyonlarda, *S. aureus*'un hücre yüzeyinde bulunan ve hücre dışına salgılanan virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır. *S. aureus* izolatlarının virülansı, tek başına bu biyolojik faktörlerden herhangi birisine bağlı olmayıp birkaçının

beraber oluşturduğu etkiler sonucu oluşmaktadır. *S.aureus* beş farklı sitolitik ya da membran yıkıcı toksin [alfa, beta, gama, delta ve Panton Valentin lökositin (PVL)], iki eksfoliyatif toksin (A ve B), sekiz enterotoksin (A-E, G-I) ve toksik şok sendromu toksin-1 (TŞST-1) gibi çok sayıda toksin oluşturmaktadır³. Stafilokokal enterotoksinler (SE)'in neden olduğu gıda zehirlenmeleri, gıda kaynaklı gelişen hastalıkların en sık ikinci nedenidir⁴. Stafilokokların oluşturduğu bir başka toksin olan TŞST-1, özellikle menstrüel dönemde gelişen toksik şok sendromu olgularının %90'ından fazlasında tespit edilmektedir⁵.

S.aureus'un önemli virülans faktörlerinden biri de PVL'dir. PVL'nin özellikle polimorfonükleer lökositler (PMNL) üzerinde açtığı porlar sayesinde hücre lizisine neden olarak etkisini gösterdiği tahmin edilmektedir³. PVL toksinine sahip olan izolatların ciddi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömonilere neden olduğu bilinmektedir⁶. *S.aureus*'un sahip olduğu yapısal ya da kazanılmış antimikrobiyal ilaç direnç özelliği de önemli bir virülans faktörü olarak gösterilmektedir⁷. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) dünya genelinde epidemi ve endemilere yol açan bir bakteri haline gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplum ve hastane kaynaklı *S.aureus* izolatlarında stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC ve SED), TŞST-1, PVL varlığının ve SCCmec fenotiplerinin (MRSA izolatlarında) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi ile tespit edilmesi ve MLVA (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) yöntemiyle hastane ve toplum kaynaklı izolatlar arasındaki klonal ilişkinin incelenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar, Tanımlama ve Antibiyotik Direnci

Çalışmaya Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Mikrobiyoloji Laboratuvarına Kasım 2007-Aralık 2010 tarihleri arasında kliniklerde yatan ve polikliniklere başvuran hastalardan gönderilen örneklerden izole edilen toplam 147 adet *S.aureus* izolatı dahil edildi. Her hastadan tek bir izolat alındı. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar CDC kriterlerine göre tanımlandı⁸. *S.aureus* üremesi olan hastaların yattıkları klinik, klinik örneğin alındığı yer ve tarih bilgileri kaydedildi.

Laboratuvara gelen örnekler tiplerine göre uygun besiyerlerine ekildi. Üreyen kolonilerden koloni morfolojileri stafilokoklara uyan, Gram ile pozitif boyanan ve katalaz testi pozitif olanlara koagülaz testi uygulandı. Tavşan plazmasında koagülasyona neden olan suşlar *S.aureus* olarak kabul edildi⁹. Geleneksel tanımlamanın doğrulanması ve antibiyogram işlemi Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemiyle yapıldı¹⁰. Oksasilin direnci, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı¹¹. Çalışmanın diğer aşamaları için saf izolatlar %10'luk skim milk solüsyonunda (Sigma, ABD) -80°C'de saklandı.

Toksin Genlerinin ve SCCmec Tiplerinin Rt-PCR ile Tespiti

Koyun kanlı agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında saf olarak üremiş *S.aureus* kolonilerinden 0.5 McFarland bulanıklık olacak şekilde süspansiyon hazırlan-

di. Buradan 1 µl bakteri süspansiyonu 24 µl'lik 1X PCR tamponu [0.2 mM dNTP (Sigma, ABD), 4 mM MgCl₂ (Sigma, ABD), primerlerin her birinden 0.5 µl (50 pmol/ml) (Metabion, Almanya), her bir florofor probdan 0.25 µl (100 pmol/ml) (Metabion, Almanya), 0.2 µl Super Hot Taq DNA polimeraz (Bioron, ABD) (5 U/µl)] karışımına eklenerek 25 µl'lik toplam hacim elde edildi. PCR döngüleri 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 40 siklus; 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma ve uzama olarak ayarlandı¹². Çalışmada *S.aureus*'a ait toksinleri kodlayan genlerin varlığını ve MRSA suşlarında SCCmec tipini belirlemek amacıyla kullanılan primer dizileri Tablo I'de verildi¹³. Multipleks PCR için beş ayrı multipleks PCR karışımı hazırlandı. Birinci multipleks karışımı *sea*, *seb*, *sec*, ikincisi *sed* ve *tst*, üçüncüsü SCCmec tip I ve SCCmec tip II, dördüncüsü SCCmec tip III ve SCCmec tip IV, sonuncusu SCCmec tip V ve *pvl* genlerinin belirlenebilmesi için hazırlandı. Hedef gen bölgelerinin tespitinde pozitif kontrol olarak *sea* için *S.aureus* ATCC 10652, *seb* için *S.aureus* ATCC 10654, *sec* için *S.aureus* ATCC 10655, *sed* için *S.aureus* ATCC 10656, *pvl* için *S.aureus* Hershey MC 901, *tst* ve SCCmec tip II için *S.aureus* N315, SCCmec tip I için *S.aureus* NCTC 10442, SCCmec tip III için *S.aureus* 85/2082, SCCmec tip IV için *S.aureus* JCSC 4744 suşları kullanıldı.

***S.aureus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi**

S.aureus DNA izolasyonu fenol:kloroform:izoamilalkol yöntemi kullanılarak yapıldı¹⁴. MLVA yönteminde farklı genotiplere ait izolatları belirlemek amacıyla kullanılan primerler Tablo II'de gösterildi^{15,16}. Bu yöntem için iki ayrı PCR karışımı hazırlandı. İlk karışım 45 µl 2X PCR tamponuna [0.2 µl Taq DNA polimeraz (Bioron, ABD) (5 U/µl) 2 mM MgCl₂ (Sigma, ABD), 0.2 mM dNTP (Sigma, ABD), SspA-F, SspA-R primerlerinden 10'ar pmol (Alpha DNA, ABD), Siru-21-F, Siru-21-R primerlerinden 1.25'er pmol (Alpha DNA, ABD), Clfb-F, Clfb-R primerlerinden 1'er pmol (Alpha DNA, ABD)] kalıp DNA'dan 5 µl eklenerek 50 µl'lik toplam hacim elde edildi. İkinci karışım ise 45 µl 2X PCR tamponu [0.2 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ µl) (Bioron, ABD), 2 mM MgCl₂ (Sigma, ABD) 0.2 mM dNTP (Sigma, ABD), Spa-F, Spa-R, ClfA-F, ClfA-R primerlerinin her birinden 10'ar pmol (Alpha DNA, ABD)] kalıp DNA'dan 5 µl eklenerek 50 µl'lik toplam hacim elde edildi. PCR döngüleri 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu; 40 siklus; 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde ayarlandı¹⁵. Elektroforez işlemini takiben örnekler için DNA bantları görüntüleme cihazında Trackit 100 bp DNA Ladder (In vitro Gen, ABD) belirteçleri ile karşılaştırıldıktan sonra elde edilen sayısal değerler Bionumerics (Applied Maths, Belçika) 6.0.1 versiyonlu program kullanılarak değerlendirildi. MLVA yöntemi her gen bölgesine ait sıralı tekrar sayısının farklı olabilmesi esasına dayandığı için en az bir banda ait değişiklik farklı bir genotip olarak değerlendirildi¹⁶.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Kullanılacak test yöntemi örnek sayısı dikkate alınarak birtakım kriterlere göre belirlendi. Tanımlayıcı istatistikler gözlem

Tablo I. Çalışmada kullanılan primer ve problemlerin oligonükleotid dizilimleri

Hedef gen bölgesi	Oligonükleotid dizilimi (5'→3')	Kaynak
<i>sea</i>	F GGGATTAATCGTGTTCATACTTCTA	Bu çalışma
	R ATTCTTAATAGTGATTGAATTCTGTCC	
	P [FAM]-AACCTTCGGTTAATTACGATTATTGGTGC-BHQ-1	
<i>seb</i>	F TGACGTACAACTAATAAGAAAAAGG	Bu çalışma
	R TATATCCCGTTTCATAAGGCGAG	
	P [VIC]-ACTGCTCAAGAATTAGATTACCTAACTCG- BHQ-1	
<i>sec</i>	F CTTTTGAAGTGCAAACTGATAAGAAA	Bu çalışma
	R ATATGGTGAACTGTAACTCATAACA	
	P [TEXAS RED]-TGTAACAGCTCAAGAAGTAGACATAAAAGC-BHQ-2	
<i>sed</i>	F AGATAGGACTGCTTGACATATG	Bu çalışma
	R TATCCACAAATTGATTGGTATTTT	
	P [CYS]-AGGTGCTACTCCACACGAAGGTAAT-BHQ-1	
<i>tst</i>	F AGACTTTGAAATTCGTCATCAGCT	Bu çalışma
	R GATCCGTCATTGTTATTTTCC	
	P [TEXAS RED]-ACTCAAATACATGGATTATATCGTTCAAGCG-BHQ-2	
<i>pvl</i>	F AAAATGCCAGTGTTATCCAGAGGTA	Kılıç ve ark. ¹³
	R TTTGCAGCGTTTGTGTTTCG	
	P [FAM]-TTACAATCGTCGAAGAAC-BHQ-1	
SCCmec tip I	F TTTGGCAGCTAATACTTCCGATT	Kılıç ve ark. ¹³
	R AAAATTCAACATTTTGGCGATGA	
	P [FAM]-TTACAATCGTCGAAGAAC-BHQ-1	
SCCmec tip II	F AACGAGACGTGCCAAGAAG	Kılıç ve ark. ¹³
	R CATCAGTTCATGTTTACTATTAGGTATTTGTC	
	P [VIC]-ATTTGCCGCTGGGCT-BHQ-1	
SCCmec tip III	F GCAGAACAGATAATCGAACAGGCTAT	Kılıç ve ark. ¹³
	R GCGATAACAACATAATACGTCACATTG	
	P [FAM]-AACGCATCCAACAAA-BHQ-1	
SCCmec tip IV	F GAACAGACCTGAGCTCCAACGT	Kılıç ve ark. ¹³
	R GGTGTTGTYTTGAKAYCATAACACA	
	P [VIC]-AAGATGCAAAAGAAGGCAATA-BHQ-1	
SCCmec tip V	F GGTTATACGATGCATTACTGAGAGA	Kılıç ve ark. ¹³
	R TAACGACCGCCAAAAAGAAATGAC	
	P [VIC]-CTTCAATCCAGAATTATTGGTGT-BHQ-1	

Se: Stafilokokkal enterotoksin; pvl: Panton-Valentin lökositidin; tst: Toksik şok sendromu toksin-1; SCC: Stafilokokkal kromozomal kaset; F: Forward; R: Reverse; P: Prob.

Tablo II. MLVA Yönteminde Kullanılan Primerler

Hedef gen bölgesi		Oligonükleotid dizilimi (5'→3')	Kaynak
CLFA	F	GATTCTGACCCAGGTCAGA	Sabat ve ark. ¹⁵
	R	CTGTATCTGGTAATGGTCTTT	
CLFB	F	ATGGTGATTGAGCAGTAAATCC	Sabat ve ark. ¹⁵
	R	CATTATTTGGTGGTGAACCTT	
SPA	F	AGCACCAAAAGAGGAAGACAA	Sabat ve ark. ¹⁵
	R	GTTTAACGACATGTACTCCGT	
SSP	F	ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA	Sabat ve ark. ¹⁵
	R	TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	
SIRU-21	F	AGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	Rasschaert ve ark. ¹⁶
	R	GCTCAAGCACCAAAAGAGGA	

CLF: Clumping factor, SPA: Stafilokokal protein A, SSPA: Stafilokokal serin proteaz, SIRU: Staphylococcal interspersed repeat units; F: Forward; R: Reverse.

sayısı ve yüzde şeklinde verildi. Kategorik karşılaştırmalar için Pearson ki-kare ve Fisher'in kesin testi kullanıldı; $p \leq 0.05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edildi¹⁷.

BULGULAR

Bu çalışmaya, toplum kaynaklı 75 (%51.1) ve hastane kaynaklı 72 (%48.9) olmak üzere toplam 147 *S.aureus* izolatu dahil edilmiştir. Metisilin direnci hastane kaynaklı izolatların %61.1 (44/72)'inde, toplum kaynaklı izolatların %6.75 (n= 5/75)'inde tespit edilmiştir. Hastane kaynaklı izolatlar en sık kan örneklerinden (35/72, %48.7), toplum kaynaklı örnekler ise en sık idrar örneklerinden (34/75, %45.3) izole edilmiştir. MRSA izolatları değerlendirildiğinde ise hastane kaynaklı izolatların en sık kan örneklerinden (18/44, %40.9), toplum kaynaklı olanların ise idrar örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Tablo III).

Toplam 147 izolatın 93 (%63.2)'ünde bir veya birden fazla toksin varlığı saptanmış; bu izolatların 77'sinde sadece bir toksin tespit edilirken, 16'sında birden fazla toksin tespit edilmiştir. Toksin tespit edilen izolatların %59.1 (55/93)'i hastane kaynaklı, %40.9 (38/93)'u ise toplum kaynaklıdır. SEA toplam 147 izolatın 59 (%40.1)'unda, SEB 8 (%5.4)'inde, SEC 12 (%8.1)'inde, SED 8 (%5.4)'inde, TSST-1 17 (%11.5)'inde ve PVL 6 (%4)'sında tespit edilmiştir. Birden fazla toksin içeren izolatlarda en sık SEA ile TSST-1 kombinasyonunun (6/16, %37.5) olduğu izlenmiştir. Bunu sırasıyla SEA + SEB (3/16, %18.7) ve SEB + PVL birlikteliği (2/16, %12.5) takip etmiştir. SEC ile TSST-1; SED ile TSST-1, SED ile PVL ise yalnızca birer izolatta beraber olarak tespit edilmiştir. Sadece bir suşta SEC, TSST-1 ve PVL'nin her üçü birarada saptanmıştır. PVL saptanan altı suşun tamamı toplum kaynaklı *S.aureus* olup, üç tanesi apse, iki tanesi yara, bir tanesi de idrar örneğinden izole edilmiştir.

Tablo III. *S.aureus* Suşlarının İzole Edildiği Klinik Örneklerle Göre Dağılımları

Klinik örnekler	<i>S.aureus</i>		Toplam n= 147 (%)
	Hastane kaynaklı n= 72 (%)	Toplum kaynaklı n= 75 (%)	
İdrar	4 (5.5)	34 (45.3)	38 (25.8)
Yara sürüntüsü (deri ve yumuşak doku)	16 (22.2)	21 (28)	37 (25.1)
Kan	35 (48.7)	0	35 (23.8)
Derin apse, aspirat materyali	10 (13.9)	17 (22.7)	27 (13.8)
Kateter	3 (4.2)	0	3 (2.1)
Diğer*	4 (5.5)	3 (4)	7 (4.9)

* Konjunktiva sürüntüsü, plevral sıvı, balgam, transtrakeal aspirat, bronkoalveoler lavaj, biyopsi materyali.

Çalışmada tespit edilen toksinlerin hastane ve toplum kaynaklı izolatlar arasındaki dağılımı incelendiğinde, hastane kaynaklı izolatlarda toksin bulunma sıklığının daha fazla olduğu ve bu iki kaynak grup arasında SEA, SEC, SED ile PVL dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir (Tablo IV).

Hastane kaynaklı (HK) ve toplum kaynaklı (TK) izolatların antibiyotiklere direnç durumlarına bakıldığında; tüm izolatların vankomisin, teikoplanin ve linezolidde duyarlı olduğu görülmüştür. HK izolatlar, kinupristin-dalfopristin, trimetoprim-sülfametoksazol ve penisilin G dışındaki antibiyotiklere TK izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha dirençli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo V). Metisilin direnci HK izolatların %61.1 (44/72)'inde, TK izolatların %6.75 (n= 5/75)'inde tespit edilmiştir. TK grupta metisiline dirençli olan suşların 2'sinde SCCmec tip IV kromozomal gen kaset bölgesi saptanırken, üç izolat tiplendirilememiştir. HK grupta metisiline dirençli olan toplam 44 izolatın 40'ında (%90.9) SCCmec tip III, birinde (%2.2) tip IV bulunmuş; üç izolat tiplendirilememiş-

Tablo IV. Tespit Edilen Toksinlerin Toplum ve Hastane Kaynaklı İzolatlarda Görülme Sıklığı

Toksinler	PCR pozitifliği n= 147 (%)		p
	TK- <i>S.aureus</i> n= 75 (%)	HK- <i>S.aureus</i> n= 72 (%)	
SEA	12 (16)	47 (65.2)	< 0.001
SEB	3 (4)	5 (6.9)	0.488
SEC	10 (13.3)	2 (2.7)	0.019
SED	8 (10.6)	0	0.006
TŞST-1	10 (13.3)	7 (9.7)	0.494
PVL	6 (8)	0	0.028
En az bir toksin varlığı	38 (50.7)	55 (76.4)	0.001

SE: Stafillokokal enterotoksin; PVL: Panton-Valentin lökositidin; TŞST-1: Toksik şok sendromu toksini-1; TK: Toplum kaynaklı; HK: Hastane kaynaklı, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo V. Hastane ve Toplum Kaynaklı *S.aureus* Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri

Antibiyotikler	HK- <i>S.aureus</i> n= 72 (%)	TK- <i>S.aureus</i> n= 75 (%)	p
Siprofloksasin	43 (59.7)	1 (1.3)	< 0.001
Klindamisin	28 (38.9)	6 (8)	< 0.001
Eritromisin	34 (47.2)	6 (8)	< 0.001
Gentamisin	42 (58.3)	4 (5.3)	< 0.001
Rifampisin	43 (59.7)	5 (6.7)	< 0.001
Metisilin	44 (61.1)	5 (6.7)	< 0.001
Trimetoprim-sülfametoksazol	2 (2.8)	1 (1.3)	Tespit edilmedi
Tetrasiklin	42 (58.3)	3 (4)	< 0.001
Penisilin G	71 (98.6)	75 (100)	0.490
Kinupristin-dalfopristin	1 (1.4)	0	0.490

HK: Hastane kaynaklı; TK: Toplum kaynaklı.

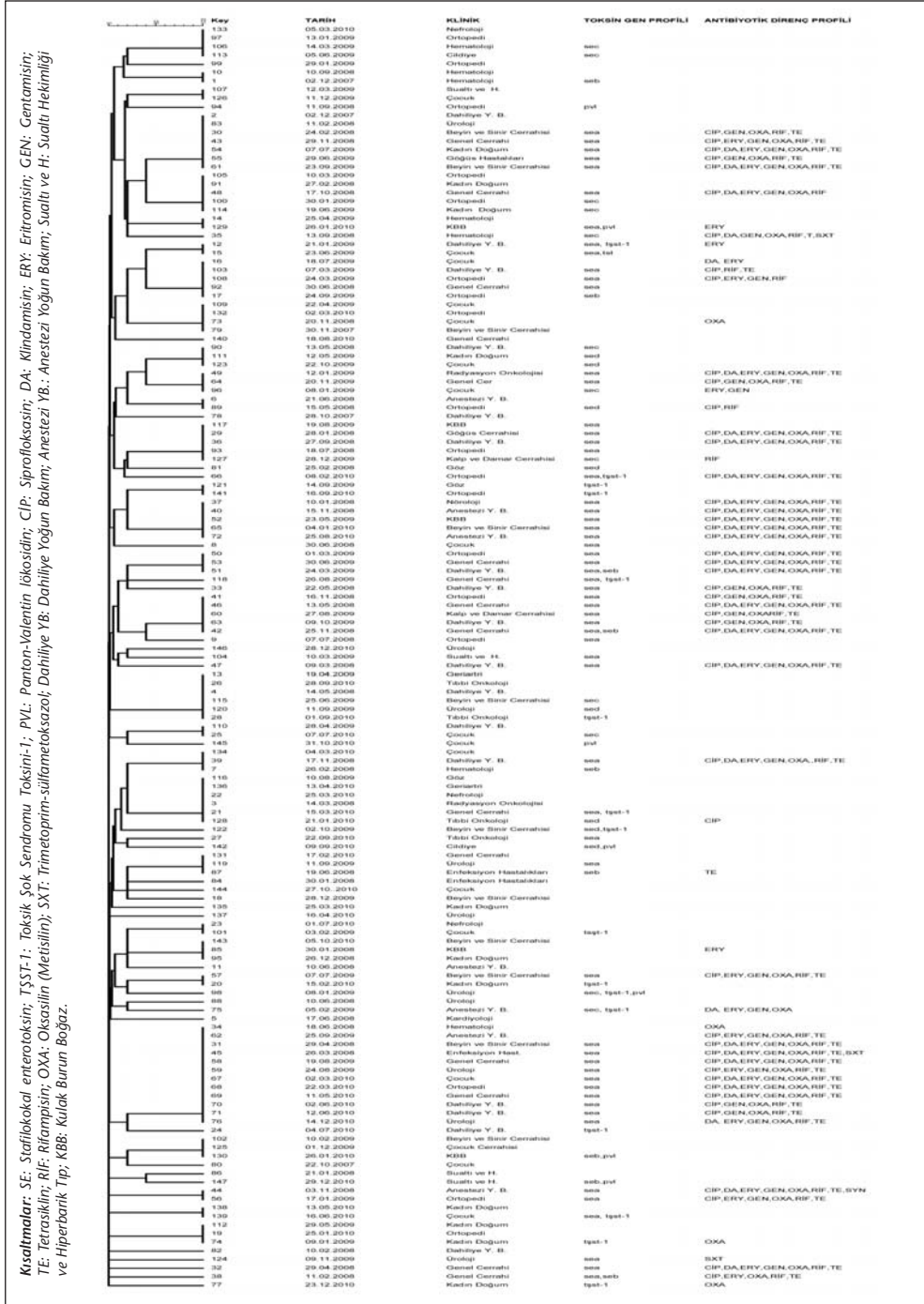
tir. Toksin varlığı ile izolatların antimikrobiyal direnç profilleri arasındaki ilişki incelendiğinde; SEA taşıyan izolatların %74.5 (44/59)'inde çoklu ilaç direnci tespit edilirken, diğer toksin taşıyan izolatların hiçbirinde çoklu ilaç direnci tespit edilememiştir. HK izolatları içerisinde SEA pozitif izolatların %85.7 (40/47)'sinin metisiline dirençli olduğu görülmüştür. HK-MRSA'ların %95.4 (42/44)'ünde SEA tespit edilmiştir.

MLVA yöntemiyle yapılan filogenetik analiz değerlendirildiğinde; izolatların 67 farklı klonu sahip olup, bu klonlar içerisinde 37'sinin özgün profil sergilerken diğer 30 klonun içerisinde birden fazla izolat bulunan küme yapısında olduğu görülmüştür. Küme içerisinde yer alan izolatların sayısı ise 110'dur. Dolayısıyla kümeleşme oranı %74.8 (110/147) olarak tespit edilmiştir. Küme genişliği ise 2 ila 12 izolat arasında değişmektedir (Şekil 1). Hastane kaynaklı 72 izolatın MLVA yöntemi ile yapılan filogenetik analizinde toplam 34 farklı klon tespit edilirken, bunların 19'unun özgün profile sahip olduğu [altısı MRSA, 13'ü metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA)] 15'inin küme yaptığı ve bu kümeler içerisindeki izolat sayısının 53 olduğu (53/72, %73.6) tespit edilmiştir. Küme genişliği ise 2-11 izolat arasında değişmektedir. Toplum kaynaklı 75 izolatın MLVA yöntemi ile yapılan filogenetik analizi değerlendirildiğinde ise farklı klon sayısının (47 klon) ve özgün profil sayısının (32 özgün profil) hastane kaynaklı izolatlardan fazla olduğu, küme sayısının aynı olduğu (15 küme), kümeler içerisindeki izolat sayısının ise daha az olduğu (43/75, %57.3) görülmüştür. Küme genişliği ise 2 ila 4 izolat arasında değişmektedir.

TARTIŞMA

S.aureus hem sağlıklı kişiler hem de çeşitli nedenlerden dolayı bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli etkenlerden biridir¹⁸. Çalışmamızda HK ve TK *S.aureus* suşlarında önemli olduğu düşünülen virulans faktörleri araştırılarak iki grubun birbiriyle olan genotipik ilişkisi incelenmiştir. Toplum kaynaklı MRSA ve MSSA izolatlarının yaptığı enfeksiyonlar genel olarak birbirine

Hastane ve Toplum Kaynaklı *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Araştırılması



Şekil 1. Tüm izolatların MLVA analizinden elde edilen dendrogram.

benzemekte ve bu izolatlar en sık deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE)'na neden olmaktadır¹⁹. Naimi ve arkadaşlarının²⁰ yaptığı çalışmada TK-MRSA izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar arasında DYDE %75 sıklıkla ilk sırada gelmektedir. Herold ve arkadaşlarının²¹ yaptığı çalışmada da %49.1 sıklıkla DYDE ilk sırada gelirken bu enfeksiyonları derin doku enfeksiyonları (%25.8) izlemektedir. Çalışmamızda, diğer çalışmaların aksine toplum kaynaklı MRSA ve MSSA izolatları en sık olarak idrar örneklerinden (34/75, %45.3) izole edilmiştir. Bu durumun ciddi DYDE'nin gelişmesine yol açan *S.aureus*'larda var olan PVL'nin izolatlarımızın çoğunda bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

HK *S.aureus* izolatlarının en sık olarak bakteriyemi şeklinde klinik tablo oluşturduğu bildirilmektedir^{21,22}. İtalya'da yapılan bir çalışmada HK *S.aureus* izolatlarının tüm klinik tablolar içerisinde %60.2 oranında bakteriyemiye neden olduğu tespit edilmiştir²³. Klevens ve arkadaşlarının²⁴ çalışmasında da HK-MRSA enfeksiyonları içerisinde bakteriyemi %75.6'lık sıklıkla yine en sık tespit edilen enfeksiyon olmuştur. Çalışmamızda, HK *S.aureus*'ların diğer çalışmalarla uyumlu olarak en sık bakteriyemiye (%48.7) ikinci sıklıkla ise DYDE'ye (%22.2) neden olduğu tespit edilmiştir. HK izolatlar TK izolatlarla kıyaslandığında daha invazif enfeksiyonlar oluşturduğu görülmüştür. Bu durumun özellikle HK izolatların çoğunun metisiline dirençli olmalarına ve en az bir toksin taşıyan izolat sayısının daha fazla olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür ($p < 0.001$).

Çalışmamızda, TK ve HK suşlarda stafilokokal enterotoksinler grubunda yer alan toksinler (SEA, SEB, SEC ve SED) ile PVL ve TŞST-1 sıklığı araştırılmıştır. Bu toksinlerin seçilmesindeki amaç toksinlerin süperantijen özelliğinde olup immün sistemi oldukça güçlü bir şekilde etkileyebilmeleridir³. Kim ve arkadaşları²⁵ tarafından yapılan çalışmada toksinlerden en az birinin tespit edildiği izolatların tüm izolatlara oranı %73.4, Hu ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında ise %62.4 olarak bildirilmiştir. Demir ve arkadaşlarının²⁷ çalışmasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 120 *S.aureus* izolatının %61.4'ünde en az bir toksin tespit edilmiştir. Çalışmamızda, tüm izolatlar değerlendirildiğinde en az bir toksine sahip izolat oranı (%63.2) hem yurt içi hem de yurt dışı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Araştırılan toksinler içerisinde farklı toksinler değişik oranlarda tespit edilebilmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada²⁷ SEA %26.4, Japonya²⁶ ve İtalya'da²³ yapılan çalışmalarda SEC sırasıyla %43.4 ve %58.9, Çin'de²⁵ yapılan çalışmada ise TŞST-1 %40.8 oranıyla en sık tespit edilen toksin olmuştur. Çalışmamızda SEA en çok tespit edilen toksindir (59 izolat; %40.1). SEA taşıyan izolatların 47 (%79.6)'si hastane, 12'si ise toplum kaynaklıdır ($p < 0.001$). Bu veriler, toksinlerin bulunma sıklığının coğrafi özelliklere göre değişkenlik gösterebildiğini vurgulamaktadır.

HK ve TK izolatların toksin profilleriyle ilgili olarak yapılmış çok fazla çalışma olmamakla beraber, İtalya'da yapılan bir çalışmada SEC varlığı TK ve HK izolatlarının sırasıyla %75.5 ve %53.2'sinde, TŞST-1 varlığı ise %8.1 ve %27.7'sinde tespit edilmiş ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur²³. Çalışmamızda ise araştırılan toksinler içerisinde SEA, HK izolatlarda ($p < 0.001$), SEC ve SED ise TK izolatlarda (sırasıyla $p = 0.019$ ve $p = 0.006$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratacak şekilde daha sık tespit edilmiştir.

PVL, sıklıkla TK-MRSA suşlarında tespit edilen bir virülans belirtici olup çoğunlukla nekrotizan pnömoni ve ciddi DYDE ile ilişkilidir²⁸. 2005 yılında İngiltere’de yapılan epidemiyolojik bir çalışmada²⁹ *S.aureus* izolatlarında PVL sıklığı %1.6, Fransa’da³⁰ ise %2 olarak tespit edilmiştir. PVL 2003-2006 yıllarını kapsayan dönemde hastanemizdeki yapılan çalışmada MRSA izolatları arasında %1.3 (5/370) oranında tespit edilmiştir¹². Türkiye’de yapılan farklı çalışmalarda PVL’nin *S.aureus* izolatlarında saptanma oranının %2-3.9 arasında değiştiği bildirilmektedir^{9,31}. Çalışmamızda izole edilen HK suşlarda PVL saptanmamış olmakla beraber, bu toksini taşıyan suşların ek virülans özelliği kazandığı bilindiğinden⁶ HK-MRSA suşlarında bu toksinin varlığının takip edilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda TK *S.aureus* izolatlarında da metisilin direncinin artmakta olduğu görülmektedir³². Çalışmamızda bu oran %6.7 olarak bulunurken yurt içinde yapılan iki farklı çalışmada bu oranlar %21.6 ve %27 olarak tespit edilmiştir^{33,34}. Yurt dışında bu oran Scazzocchio ve arkadaşlarının²³ çalışmasında %19.1, Groom ve arkadaşlarının³⁵ çalışmasında ise %58.9 olarak bildirilmiştir. Yurt içi ve dışından yapılan çalışmalarla kıyaslandığında çalışmamızda yer alan TK izolatları arasındaki düşük metisilin direnci oranı dikkat çekmektedir.

Metisiline dirençli olan izolatların SCCmec tipleri incelendiğinde, tip IV ve V’in genellikle TK-MRSA izolatlarında, SCCmec tip I, II ve III’ün ise HK suşlardan izole edilmesi, yakın zamana kadar bu tiplendirmeyi HK ve TK MRSA izolatlarını birbirinden ayırt etmek için kullanılabilir kılmaktaydı³⁶. SCCmec tip IV ve V taşıyan suşların HK yayılımı yapma potansiyeliyle beraber hastane ortamında görülmesi, SCCmec tip I, II, III taşıyan suşların da nihayetinde toplum içerisinde yayılabileceğini düşündürmektedir^{12,37}. Bu nedenle SCCmec tiplendirmesi TK ve HK MRSA izolatlarının klonal yayılımını birbirinden ayırt edebilecek bir yöntem olarak değerlendirilmemektedir¹². Çalışmamızda HK-MRSA suşlarında %90.9 (40/44) oranında SCCmec tip III, %2.2 (1/44) oranında SCCmec tip IV, TK-MRSA suşlarında ise %40 (2/5) SCCmec tip IV tespit edilirken geri kalan izolatların tiplendirilmesi yapılamamıştır.

Toksin varlığı ile izolatların antimikrobiyal direnç profilleri beraber değerlendirildiğinde, SEA taşıyan izolatların %74.5 (44/59)’inde çoklu ilaç direnci tespit edilmiştir. Özellikle HK izolatları değerlendirildiğinde SEA pozitif izolatların %85.7 (40/47)’sinin metisiline dirençli olduğu görülmüştür. HK-MRSA izolatları genel olarak beta-laktam grubunun dışında kalan antibiyotiklere çoklu ilaç direnci göstermektedir³⁸. HK-MRSA’ların 42’sinde SEA varlığının gösterilmesi, direnç gelişimi ile SEA varlığı arasında bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir. SEA dışında kalan toksinler değerlendirildiğinde izolatların SEB, SEC, SED ve TŞST-1 toksinlerinden birisine sahip olsa bile herhangi bir direnç paterni ile ilişkilendirilemediği görülmüştür. SE’ler ile direnç arasındaki ilişkinin gösterilebilmesi için bu toksin genlerinin izolatlardaki kromozomal yerleşimlerinin ileri yöntemlerle incelenmesi gerekmektedir.

MLVA yöntemi ile stafilokokların genotipik tiplendirme sonuçları PFGE ve diğer tiplendirme yöntemlerinin sonuçlarıyla paralellik göstermektedir^{14,39}. Çalışmamızda MLVA analizi sonucunda HK grubun içerisindeki izolatların %73.6, TK olanların ise %57.3 ora-

nında kümeleşme yaptığı tespit edilmiştir. Bu sonuç HK izolatların genetik homojenitesinin TK izolatlarla kıyasla yüksek, heterojenitesinin ise düşük olduğunu göstermektedir. Her iki gruptaki izolatların yarısından fazlasının küme içerisinde bulunması ise aktif ya da devam eden bulaşı göstermektedir. Detaylı yapılan kümeleşme analizleri *S.aureus* izolatlarının gerek hastane gerekse de toplum içerisinde yayılımını önlemek amacıyla geliştirilen kontrol stratejileri için çok önemli bilgiler sağlayacaktır. Tüm izolatların filogenetik analizi incelendiğinde kümeleşme oranı %74.8 olarak bulunmuştur. Bu oran, toplum ve hastane kaynaklı izolatlarda ayrı ayrı değerlendirildiğinde düşmektedir (HK grup %73.6, TK grup %57.3). Bu sonuç HK ve TK izolatların beraber aynı küme içerisinde yer aldığı ve suşlar HK ve TK olarak gruplara ayrıldığında kendi grubu içerisinde bu suşların özgün profil sergilediği şeklinde yorumlanmıştır. HK izolatlar içerisinde metisiline dirençli ve duyarlı olan suşlar incelendiğinde 44 adet HK-MRSA içerisinde özgün profili olan 6 izolat varken, 28 adet HK-MSSA içerisinde bu sayı 13 olarak bulunmuştur. Buradan da anlaşılabileceği gibi hastane kaynaklı grup içerisinde metisiline dirençli olan izolatların genotipik ilişkisi metisiline duyarlı olan izolatlara göre daha kuvvetlidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın tüm aşamalarındaki yardımlarından ötürü Dr. Bio. Aylin Üsküdar Güçlü, Bio. Sinem Kaya İnanc ve laboratuvar teknisyeni Yakup Alptekin'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Nhan TX, Leclercq R, Cattoir V. Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and clinical impact. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(6): 719-25.
2. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20(4): 250-78.
3. Bohach GA. *Staphylococcus aureus* exotoxins, pp: 464-77. In: Vincent AF, Richard PN, Joseph JF (eds), Gram-Positive Pathogens. 2006, 2th ed. ASM Press, Washington, DC.
4. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins 2010; 2(8): 2177-97.
5. Manders SM. Toxin-mediated streptococcal and staphylococcal disease. J Am Acad Dermatol 1998; 39(3): 383-98.
6. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. Lab Invest 2006; 87(1): 3-9.
7. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005; 40(4): 562-73.
8. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 2008; 36(5): 309-32.
9. Cirit OS. *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Pantone-Valentine lökositidin varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2009. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun.
10. Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, König W, König B. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. J Clin Microbiol 2006; 44(8): 2824-30.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th Informational Supplement. Document M100-S20, 2010. CLSI, Wayne, PA.

12. Kiliç A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydoğan H, Basustaoglu 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(4): 607-14.
13. Kiliç A, Li H, Stratton CW, Tang YW. Antimicrobial susceptibility patterns and staphylococcal cassette chromosome mec types of, as well as Pantone-Valentine leukocidin occurrence among, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children and adults in middle Tennessee. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12): 4436-40.
14. Kumar R, Yadav BR, Dev K, Singh RS. A simple protocol for DNA extraction from *Staphylococcus aureus*. <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNA-Extraction-from-Staphylococcus-Aureus-4999.html>
15. Sabat A, Krzysztan-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1801-4.
16. Rasschaert G, Vanderhaeghen W, Dewaele I, et al. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3313-22.
17. Baranovich T, Zaraket H, Shabana II, Nevzorova V, Turcutyucov V. Molecular characterization and susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals and the community in Vladivostok, Russia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6):575-82.
18. Van der Mee-Marquet N, Blanchard M, Domelier AS, Quentin R. Virulence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various origins. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(10): 579-83.
19. Padmanabhan RA, Fraser TG. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Cleve Clin J Med* 2005; 72(3): 235-41.
20. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003; 290(22): 2976-84.
21. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 1998; 279(8): 593-8.
22. Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis* 2008; 46(6): 787-94.
23. Scazzocchio F, Aquilanti L, Tabacchini C, Lebba V, Passariello C. Microbiological and molecular characterization of nosocomial and community *Staphylococcus aureus* isolates. *Epidemiol Infect* 2011; 139(4): 613-22.
24. Kleven RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators, invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 2007; 298(15): 1763-71.
25. Kim JS, Song W, Kim HS, et al. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) subtype classification, and their toxin gene profiles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56(3): 289-95.
26. Hu DL, Omoe K, Inoue F, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Med Microbiol* 2008; 57(Pt 9):1106-12.
27. Demir C, Aslantaş O, Duran N, Ocak S, Ozer B. Investigation of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated in Mustafa Kemal University Hospital. *Turk J Med Sci* 2011; 41 (2): 343-52.
28. Boussaud V, Parrot A, Mayaud C, et al. Life-threatening hemoptysis in adults with community-acquired pneumonia due to Pantone-Valentine leukocidin-secreting *Staphylococcus aureus*. *Intensive Care Med* 2003; 29(10):1840-3.
29. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2384-90.
30. Issartel B, Tristan A, Lechevallier S, et al. Frequent carriage of Pantone-Valentine leukocidin genes by *Staphylococcus aureus* isolates from surgically drained abscesses. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3203-7.

31. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Pantone-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2008; 14(3): 203-10
32. Maree CL, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(2): 236-42.
33. Altöparlak Ü, Uslu H, Kireççi E, Aktaş F. Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci. *Ankara Derg* 2002; 16(1): 69-72.
34. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Özbakkaloğlu B, Teker A. Metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *İnfeksiyon Derg* 2007; 21(4): 187-91.
35. Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* 2001; 286(10):1201-5.
36. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *Microbiol* 2002; 40(11): 4289-94.
37. Seybold U, Halvosa JS, White N, Voris V, Ray SM, Blumberg HM. Emergence of and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of community origin in intensive care nurseries. *Pediatrics* 2008; 122(5): 1039-46.
38. Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, et al. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1): 196-203.
39. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(18): 3057-71.