

Toplum ve Hastane Kökenli *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Panton-Valentine Lökositidin Varlığının ve Klonal İlişkinin Araştırılması*

Investigation of the Presence of Panton-Valentine Leukocidin and Clonal Relationship of Community- and Hospital-Acquired Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*

Yücel DUMAN¹, Mehmet Sait TEKEREKOĞLU², Barış OTLU²

¹ Afşin Devlet Hastanesi, Kahramanmaraş.

¹ Afşin State Hospital, Kahramanmaraş, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² Inonu University Faculty of Medicine, Research and Practice Hospital, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

* Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/51 proje numarası ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 06.05.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.06.2013

ÖZET

Staphylococcus aureus, toksin ve enzimleri ile toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerden birisidir. Bir sitotoksin olan Panton-Valentine lökositidin (PVL), özellikle deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömoniye neden olan toplum kökenli *S.aureus* suşları tarafından salgılanmaktadır. PVL polimorfonükleer lökositlerde nekroz veya apoptozise neden olarak bakterinin virülansında büyük önem taşımaktadır. PVL, *S.aureus*'a bağlı enfeksiyonların klinik seyrini araştırarak, komplikasyon gelişmesine neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar toplum kökenli *S.aureus* suşlarının önemli virülans faktörü olan PVL'nin hastane ortamlarına hızla yayılmaya başladığını göstermektedir. Çalışmamızda, hastane ve toplum kökenli *S.aureus* suşlarında PVL varlığının saptanması ve PVL pozitif suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden (yara, kan, trakeal aspirat, idrar, dren, kateter, parasentez sıvısı) izole edilen ve CDC kriterlerine göre tanımlanan 88 toplum kökenli ve 177 hastane kökenli olmak üzere toplam 265 *S.aureus* suşu dahil edilmiştir. *S.aureus* suşlarında metisilin direnci konvansiyonel yöntemlerle, PVL ve *mecA* gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu ile, PVL pozitif saptanan suşlar arasındaki klonal ilişki ise değişken alanlı jel elektroforezi (Pulsed field gel electrophoresis; PFGE) yöntemiyle araştırılmıştır. Toplum kökenli (TK) suşların %12.5 (11/88)'i, hastane kökenli (HK) suşların %43 (76/177)'ü metisiline dirençli olarak bulunmuştur. TK-*S.aureus* suşları %86 oranı ile en sık yaradan, HK suşların ise %34'ü yara ve %33'ü kandan izole edilmiştir. TK suşlarda %15, HK suşlarda

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Yücel Duman, Afşin Devlet Hastanesi, Kahramanmaraş, Türkiye.

Tel (Phone): +90 344 511 5305-1221, E-posta (E-mail): yucelduman244@myynet.com

%3 oranında PVL pozitifliği saptanmıştır. PVL pozitif HK suşların biri pediatri servisi, üçü yoğun bakım ünitesi ve ikisi nöroloji servislerinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. PVL pozitif TK-*S.aureus* suşlarının ise %39'u dahiliye, %23'ü cerrahi, %15'i dermatoloji, %15'i ortopedi ve %8'i pediatri polikliniklerinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. PVL pozitif TK suşların %92'si yaradan, HK suşların %67'si yara ve %33'ü kandan izole edilmiştir. PVL pozitif HK beş *S.aureus* suşu PFGE değerlendirilmesinde klonal olarak ilişkili bulunmuştur. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri Tenover kriterlerine göre incelendiğinde üçü ayırt edilemez, ikisi uzak ilişkili olarak değerlendirilmiştir. TK PVL pozitif suşlar arasında klonal olarak ilişki belirlenmemiştir. Sonuç olarak; PVL varlığının sadece toplum kökenli değil hastane kökenli *S.aureus* izolatlarında da bulunabileceği belirlenmiş ve hastane ortamında PVL pozitif suşların yayılım gösterdiği saptanmıştır. PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, salgınların ortaya çıkmasına ve morbidite ve mortalite oranlarının yükselmesine yol açabilir. Bu nedenle yapılacak epidemiyolojik çalışmalar, toplum ve hastane kökenli *S.aureus* suşlarının klonal yayılımının anlaşılmasında yardımcı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Panton-Valentine lökosidin; *Staphylococcus aureus*; toplum kökenli; hastane kökenli; metisilin direnci; klonal ilişki.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogens that cause community- and hospital-acquired infections by its toxins and enzymes. Panton-Valentine leukocidin (PVL), a cytotoxin which is especially produced by community-acquired *S.aureus* strains that cause soft tissue and skin infections and pneumonia. PVL leads to the destruction on polymorphonuclear cells by necrosis or induce apoptosis, so that it has great importance in the virulence of the organism. PVL can also exacerbate the clinical course of *S.aureus* infections and may lead to severe complications. Studies show that community-acquired PVL-positive *S.aureus* strains have become prevalent in hospital environments. In this study, we aimed to investigate the presence of PVL from hospital- and community-acquired *S.aureus* strains and to determine the clonal relationship between the PVL-positive strains. A total of 265 *S.aureus* strains isolated from different clinical samples (wound, blood, tracheal aspirate, urine, drainage, catheter, parasyntesis fluid) of which 88 were community-acquired and 177 were hospital-acquired according to the CDC criteria were included in the study. Methicillin resistance of the strains were investigated by conventional methods, the presence of PVL and *mecA* gene regions by polymerase chain reaction, and clonal relationship among the PVL positive *S.aureus* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Community-acquired 12.5% (11/88) and hospital-acquired 43% (76/177) of the strains were found resistant to methicillin. Community-acquired (CA) strains were most commonly isolated from wound samples (86%), while 34% of hospital-acquired (HA) strains were isolated from wound, and 33% were from blood samples. The rate of PVL positivity among CA- and HA-strains were found as 15% and 3%, respectively. Hospital-acquired PVL-positive strains were isolated from the samples originating from pediatric (n= 1) and neurology inpatient clinics and intensive care unit (n= 3). Thirty nine percent of PVL-positive CA-*S.aureus* strains were isolated from samples originated from internal medicine, 23% from general surgery, 15% from dermatology, 15% from orthopedic surgery and 8% from pediatrics outpatient clinics. Ninety two percent of PVL-positive CA-*S.aureus* strains have been isolated from wound samples, while 67% of HA-*S.aureus* strains from wound and 33% from blood samples. Five PVL-positive HA- methicillin-sensitive *S.aureus* strains were found clonally-related with each other by PFGE. When the macrorestriction patterns were evaluated according to Tenover criteria; three of those isolates were indistinguishable, and two were clonally unrelated. There was no clonal relationship between community-acquired strains. In conclusion we observed that PVL could be detected not only in community-acquired strains but also in hospital-acquired strains. The spread of PVL-positive strains in the hospital environment and even create epidemics, increases the risk of mortality and morbidity. Epidemiological studies will help us to understand the clonal spread of CA and HA-*S.aureus* strains.

Key words: Panton-Valentine leukocidin; *Staphylococcus aureus*; community acquired; hospital-acquired; methicillin; resistance; clonal relation.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus salgıladığı enzim ve toksinler ile hayatı tehdit eden hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biridir¹. Özellikle toplum kökenli deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S.aureus* suşları tarafından salgılanan *Panton-Valentine* lökositidin (PVL) önemli bir virülans faktörüdür. PVL; konak savunmasında önemli polimorfonükleer (PMNL), bazofil lökosit, monosit ve makrofajlar üzerine sitolitik etkisi ile porlar oluşturarak liziye neden olmaktadır. Bu sayede PVL, *S.aureus*'un immün sistemden kaçışı için kritik role sahiptir^{2,3}.

PVL pozitif *S.aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonların klinik seyri daha şiddetli olma eğilimindedir. Örneğin PVL pozitif *S.aureus* ile ilişkili pnömonide, sepsis, yüksek ateş, lökopeni, hemoptizi, plevral efüzyon ve ölüm daha sık görülmektedir⁴. Nekrotizan pnömonilerde nötropeni saptanması PVL'nin PMNL üzerine sitolitik etkilerini açıklamaktadır^{3,4}.

PVL pozitif suşların, son iki dekada dünyada artan klonal yayılımı, önemli halk sağlığı sorularına neden olmaktadır. PVL özellikle toplum kökenli *S.aureus* suşlarında gözlenmektedir. Ancak yapılan çalışmalar PVL pozitif suşların hastane ortamlarına hızla yayılmaya başladığını göstermiştir⁵. Hastanelerde yayılım gösteren mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle belirlenmesi; enfeksiyon seyrinin izlenmesi, uygulanan enfeksiyon kontrol önlemlerinin değerlendirilmesi, salgın sırasında izolatlar arasındaki klonal ilişkinin anlaşılması açısından büyük yarar sağlamaktadır. Bu nedenle hastanemizde izole edilen toplum ve hastane kökenli *S.aureus* suşlarında PVL varlığı ve sıklığı araştırılarak, klonal ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Staphylococcus aureus İzolatları

Çalışmaya, 2008-2012 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen, 88 toplum kökenli, 177 hastane kökenli *S.aureus* suşu alındı. Toplum ve hastane kökenli suşlar *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) kriterleri⁶ dikkate alınarak belirlendi.

Kültür, Antibiyogram ve Tanımlama

Skim Milk (Oxoid, İngiltere) besiyerinde -80°C'de stoklanmış olan *S.aureus* suşları; %5 koyun kanlı agara ekilerek, 35°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında yeniden saf kültürleri elde edildi. Elde edilen kolonilerin konvansiyonel yöntemlerle *S.aureus* olduğu doğrulandı. CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin ve oksasilin diskleri kullanılarak, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci belirlendi⁷.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile PVL ve *MecA* Geni Araştırılması

PVL için, Lina ve arkadaşları⁸ tarafından tanımlanan 433 baz çifti (bp) büyüklüğünde ürün oluşturan *Luk-PV-1* ve *Luk-PV-2* primerleri, *mecA* için Merlino ve arkadaşlarının⁹ tanımladığı primerler kullanıldı (Tablo I).

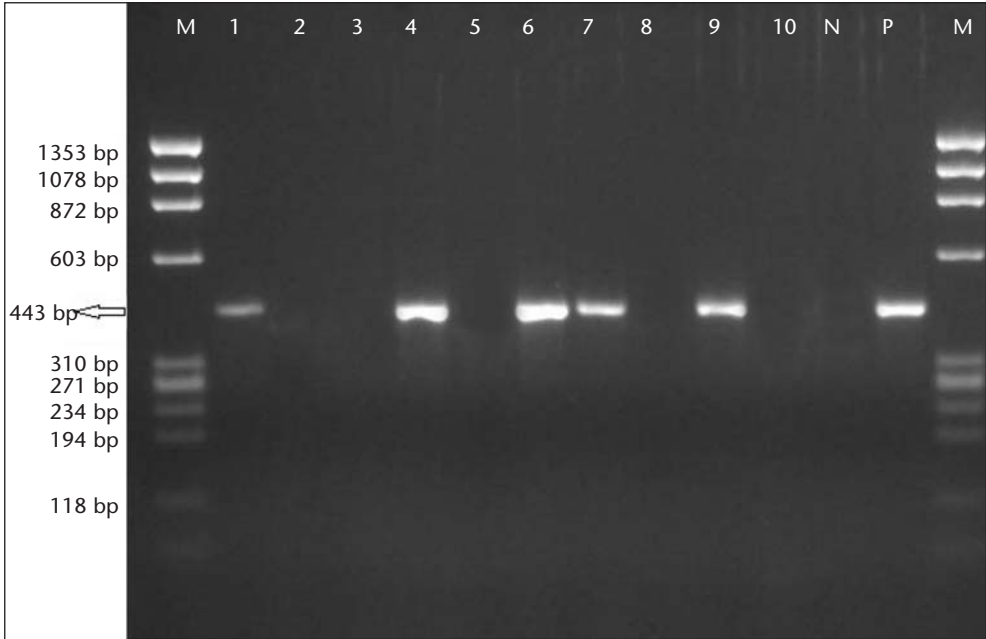
Amplifikasyon ve elektroforez sonrası görüntüleme için Gellogic 2200 Imaging System (ayrım gücü 1708 x 1280 piksel; Kodak Company, ABD) kullanılarak DNA bantları incelendi. 433 bp'lik DNA fragmentleri *lukS/F-PV* gen bölgesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 1).

Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (PFGE) Yönteminin Uygulanması

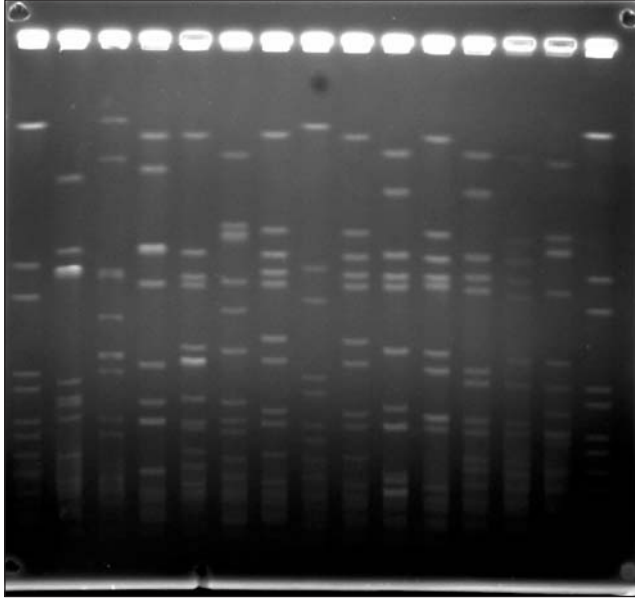
PVL pozitif *S.aureus* suşları arasındaki klonal ilişki PFGE yöntemi ile araştırıldı. PFGE yöntemi Durmaz ve arkadaşlarının¹⁰ modifiye ettikleri protokole göre yapıldı. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Belçika) belirtilen elektroforez koşulları (başlangıç vuruş süresi 5.3 saniye, bitiş süresi 34.9 saniye, vuruş açısı 120, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat) hazırlandı. Elektroforez sonrası Gellogic 2200 Imaging System kullanılarak DNA bantları görüntülendi (Şekil 2). GelCompar II yazılım sistemi ile (Version 3.0; Applied Maths, Belçika) bant profilleri analiz edildi. "Unweighted pair group method

Tablo 1. PVL ve *MecA* için kullanılan Primer Dizileri

PVL primerleri	Luk-PV-1 (Forward): 5'-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3' Luk-PV-2 (Reverse): 5'- GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC- 3'
<i>MecA</i> primerleri	Primer 1 (Forward): 5'- AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C- 3' Primer 2 (Reverse): 5'- AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C- 3'



Şekil 1. Jel elektroforezde *lukS/F-PV* sonuçlarının görünümü. Hat 2, 3, 5, 8 ve 10: Negatif örnekler; Hat 1, 4, 6, 7 ve 9: Pozitif örnekler; N: Negatif kontrol; P: Pozitif kontrol (433 bp); M: 1 kb DNA belirteci (Promega).



Şekil 2. PFGE sonrası DNA bant görüntüleri.

with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak dendrogram oluşturulup kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı; %1-1.5 olarak alındı. Sonuçlar Tenover kriterlerine göre yorumlandı¹¹.

BULGULAR

Çalışmamızda *mecA* pozitifliği referans alındığında, toplum kaynaklı (TK) suşların %12.5 (11/88)’i, hastane kaynaklı (HK) suşların ise %43 (76/177)’ü MRSA olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile MRSA olarak tespit edilen 4 suş *mecA* negatif, *mecA* pozitif 2 suş ise MSSA olarak bulunmuştur. Toplum ve hastane kökenli *S.aureus* suşlarının izole edildikleri servis, poliklinik ve klinik örneklerle göre dağılımı Tablo II ve III’te sunulmuştur.

PVL Pozitif *S.aureus* Suşlarının Değerlendirilmesi

PCR analizi sonucunda, TK 13 (%15) ve HK 6 (%3) *S.aureus* suşu PVL pozitif olarak saptanmıştır. PVL pozitif TK suşların tamamı MSSA, HK suşların ise 5’i MSSA, 1’i MRSA olarak tanımlanmıştır. HK PVL pozitif MRSA suşu yara kültüründen, HK PVL pozitif MSSA suşlarından 3’ü yara, 2’si kan kültüründen izole edilmiştir. TK PVL pozitif MSSA suşlarının ise 12 (%92)’si yara, 1 (%8)’i trakeal aspirat kültüründen izole edilen suşlardır. PVL pozitif HK-MRSA suşu pediatri servisi, HK-MSSA suşları yoğun bakım ve nöroloji servislerinden izole edilmişlerdir. PVL pozitif TK-*S.aureus* suşlarının 5 (%39)’i dahiliye, 3 (%23)’ü cerrahi, 2 (%15)’si dermatoloji, 2 (%15)’si ortopedi ve 1 (%8)’i pediatri polikliniklerinden izole edilen suşlardır.

Örnek										
	Yara	Kan	TA	Dren	İdrar	Kt	SVK	PS	Toplam sayı (%)	
Dahiliye servis	6	10	4	1	2	2	2	-	53 (30)	
	6	10	7	1	-	1	1	-		
Yoğun bakım	4	7	4	1	-	-	-	-	45 (25)	
	9	3	10	5	1	-	-	1		
Cerrahi servis	10	5	-	3	-	-	-	-	34 (19)	
	6	8	-	-	-	1	-	1		
Pediyatri servis	2	3	-	-	-	-	-	-	21 (12)	
	8	7	-	-	1	-	-	-		
Nöroloji servis	-	4	1	-	1	-	-	-	14 (8)	
	1	1	2	-	4	-	-	-		
Ortopedi servis	4	-	-	-	-	-	-	-	8 (5)	
	3	1	-	-	-	-	-	-		
Dermatoloji servis	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (1)	
Toplam sayı (%)	61 (34)	59 (33)	28 (16)	11 (6)	9 (5)	4 (2)	3 (2)	2 (1)	177 (100)	

MRSA: Metisiline dirençli *S. aureus*; MSSA: Metisiline duyarlı *S. aureus*; TA: Trakeal aspirat; Kt: Kateter; SVK: Santral venöz kateter; PS: Parasetez.

Tablo III. Toplum Kökenli *S.aureus* Suşlarının Poliklinik ve Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

		Örnek				Toplam sayı (%)
		Yara	Kan	TA	İdrar	
Dahiliye Plk	MRSA	-	1	-	-	36 (41)
	MSSA	24	4	4	3	
Dermatoloji Plk	MRSA	4	-	-	-	18 (20)
	MSSA	14	-	-	-	
Ortopedi Plk	MRSA	2	-	-	-	14 (16)
	MSSA	12	-	-	-	
Cerrahi Plk	MRSA	3	-	-	-	10 (11)
	MSSA	7	-	-	-	
Pediyatri Plk	MSSA	4	-	-	-	4 (5)
K.Doğum Plk	MRSA	1	-	-	-	3 (3)
	MSSA	2	-	-	-	
KBB Plk	MSSA	3	-	-	-	3 (3)
Toplam sayı (%)		76 (86)	5 (6)	4 (5)	3 (3)	88 (100)

Plk: Poliklinik; MRSA: Metisiline dirençli *S.aureus*; MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*; TA: Trakeal aspirat.

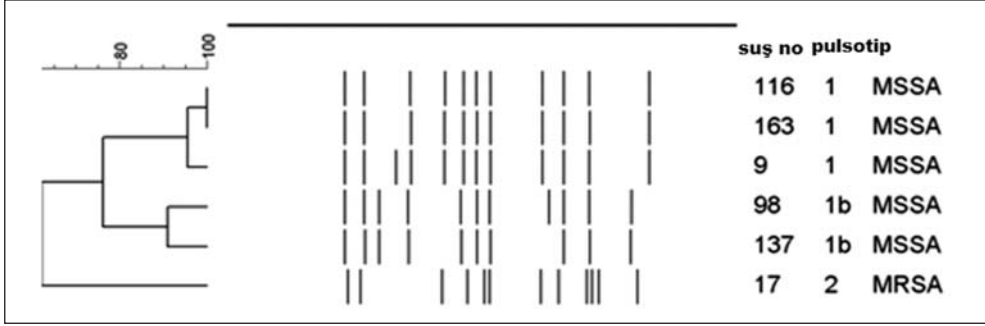
PFGE Sonuçları

PVL pozitif saptanan 13 TK ve 6 HK *S.aureus* suşu arasındaki klonal ilişki PFGE ile araştırılmış; HK 5 MSSA suşu klonal olarak ilişkili bulunmuştur. Tenover kriterlerine¹¹ göre makrorestriksiyon paternleri irdelendiğinde üçü ayırt edilemez, ikisi uzak ilişkili olarak değerlendirilmiştir. TK suşlar arasında klonal olarak ilişki belirlenmemiştir. İzolatların her birinin ayrı bir genetik tür olduğu saptanmıştır. TK ve HK-*S.aureus* suşlarının PFGE dendogram görüntüleri Şekil 3 ve 4'te gösterilmiştir.

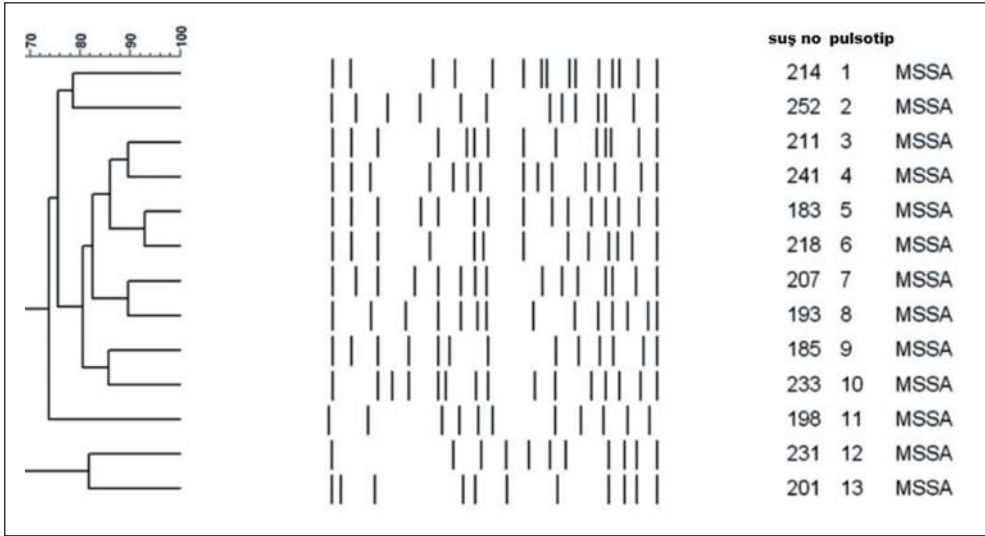
TARTIŞMA

Metisiline dirençli *S.aureus* suşları hastane enfeksiyonlarının önemli nedenleri arasındadır¹². ABD'de yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada, *S.aureus*'un neden olduğu pnömonilerde; 1986-2005 yılları arasında %12 olan MRSA oranı, 2006-2007 yıllarında %79 olarak bulunmuştur¹³. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) 2008 verilerine göre, MRSA oranları kuzey Avrupa ülkelerinde %5'in altında, İngiltere, İspanya, İtalya, Türkiye ve Yunanistan'da %25'in üzerinde, Malta ve Portekiz'de ise %50'lerde seyretmektedir¹⁴. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda MRSA oranını; Kuru-tepe ve arkadaşları¹⁵ %32, Andoğan ve arkadaşları¹⁶ %41, Ekşi ve arkadaşları¹⁷ ise %61 olarak bildirmişlerdir. Hastanemizde 2009 yılında yapılan çalışmada MRSA oranı %36 olarak bulunmuştur¹⁸. Çalışmamızda toplum kökenli (TK) suşların %12.5'i, hastane kökenli (HK) suşların ise %43'ü MRSA olarak saptanmıştır.

Yapılan araştırmalar; son iki dekada PVL varlığı ile karakterize virülen TK-*S.aureus* klonlarının küresel bir epidemi yaparak hastane ortamına hızla yayılmakta olduğunu gös-



Şekil 3. Hastane kökenli *S.aureus* suşlarının PFGE dendogram görüntüleri.



Şekil 4. Toplum kökenli *S.aureus* suşlarının PFGE dendogram görüntüleri.

termektedir¹². Bugün TK-*S.aureus* ve HK-*S.aureus* arasında ayırım yapmanın gerekliliği tartışılır duruma gelmiştir. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, salgınlar oluşturmaları, antibiyotiklere karşı direnç genlerini kazınarak, daha dirençli, daha virülan suşların ortaya çıkma riskini artırmaktadır^{2,12}.

Avrupa'da PVL pozitif *S.aureus* prevalansının artması dikkat çekicidir^{8,12}. İngiltere'de PVL pozitifliğinin istikrarlı bir artış kaydettiği, 2005 yılında TK-*S.aureus* izolatlarında %39 olan PVL gen varlığının, 2010 yılında %62'ye çıktığı bildirilmektedir¹⁹. Yunanistan'da üç yıllık sürede yapılan bir çalışmada, TK-MRSA suşlarında %72, HK-MRSA suşlarında %23 oranında PVL pozitifliği saptandığı rapor edilmiştir²⁰. Afrika'da PVL pozitif *S.aureus* suşları yaygın olarak görülmektedir; örneğin Cezayir'de %72 ve Batı Afrika'da %30 olarak bildirilmiştir^{12,21}. PVL üreten *S.aureus* suşlarının Afrika'da yüksek yaygınlığa sahip olması; bu bölgedeki istikrarsız sosyoekonomik koşullar ile bağlantılı olabilir. Bazı yazarlara gö-

re, PVL pozitif suşlar ile ilişkili HK-*S.aureus* insidansının yüksek olması hastane salgınları ile açıklanabilir²¹. Bu durum, bir TK-*S.aureus* klonuna bağlı olarak hastane salgını veya hastane personelinin bu klonu hastane içine taşımış olabileceğini düşündürmektedir. TK-*S.aureus* suşlarının hastane ortamına yayılacağı göz önüne alınacak olursa, HK ve TK-*S.aureus* ayırımı yapmak zorlaşacaktır. Gelecekte PVL geni taşıyan *S.aureus* suşları benzer klinik sendromlara neden olacağından, enfeksiyonun hastane ve/veya toplum kökenli olduğuna bakılmaksızın, hastanın sunumu anlatılırken "PVL sendromu" terimini kullanmak uygun olabilir²².

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Özkul ve arkadaşları²³ 2005 yılında %5 olan PVL pozitifliğinin 2006 yılında %10'a çıktığını belirlemişlerdir. Şimşek²⁴ HK suşların %3'ünde, TK suşların ise %5'inde PVL pozitifliği bildirmiş, ileri çalışmaların bu suşların yayılımını önlemek açısından önemli olduğunu vurgulamıştır. Karahan ve arkadaşları²⁵ MRSA suşlarının %3'ünde ve MSSA suşlarının %9'unda PVL pozitifliği saptamışlar, suşların yedisini yara, dördünü idrar ve birini eklem sıvısından izole etmişlerdir. Ayrıca PVL pozitif suşlardan 11'inin TK-MRSA, birinin HK-MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Akoğlu ve arkadaşları²⁶ HK-MRSA suşlarında %13, Öksüz ve arkadaşları²⁷ TK veya HK ayırımı yapmadan MRSA suşlarında %41 PVL pozitifliği saptamışlar; cilt, yumuşak doku ve solunum yolu örneklerinde PVL varlığının araştırılmasının ciddi enfeksiyonların önlenmesinde önemli olduğunu vurgulamışlardır. Baran ve arkadaşları²⁸ 28 HK ve iki TK-MRSA izolatında PVL araştırmışlar ve yalnızca TK-MRSA izolatlarında pozitiflik saptamışlardır. Yılmaz ve arkadaşları²⁹ 75 TK, 72 HK-*S.aureus* izolatında yaptıkları araştırmada TK-*S.aureus* izolatlarının %4'ünde, Gülmez ve arkadaşları³⁰ ise deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen 285 HK-*S.aureus* izolatının %2'sinde PVL pozitifliği bildirmişlerdir. Kırdar ve arkadaşları³¹ 37 HK-MRSA, Tekeli ve arkadaşları³² kan kültürlerinden izole edilen 100 HK-MRSA izolatında yaptıkları çalışmalarda PVL pozitifliği belirlememişlerdir. Geniş katılımlı bir çalışmada; HK suşlarda PVL pozitifliği %4 olarak saptanmış; PFGE değerlendirilmesi sonucunda suşların birbirleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur³³. Bu bulgular; TK-*S.aureus* izolatlarının önemli virülans faktörü olan PVL'nin, HK-*S.aureus* izolatlarında da bulunabileceği gerçeğini ortaya koymakta ve hastane ortamında yayılımın önlenmesi için epidemiyolojik olarak takibinin önemini göstermektedir.

Çalışmamızda *Luk-PV1* ve *Luk-PV2* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizi sonucunda, TK suşların %15'i, HK suşların %3'ü PVL pozitif saptanmıştır. PVL pozitif TK izolatların %92'si, HK izolatların ise %67'si yara ve apse kültürlerinden izole edilmiştir. PFGE analizinde; beş HK MSSA suşu klonal olarak ilişkili bulunmuştur. Bu izolatların makrorestriksiyon paternleri Tenover kriterlerine göre değerlendirildiğinde üç suş ayırt edilemez, iki suş ise uzak ilişkili olarak belirlenmiştir. Toplum kökenli PVL pozitif saptanan 13 MSSA suşu incelendiğinde; suşlar arasında klonal olarak ilişki görülmemiştir.

Genestier ve arkadaşları² PVL'nin nötrofil harabiyetinin birincil nedeni olduğunu ve nekrotizan pnömoni gibi ciddi enfeksiyonları tetiklediğini öne sürmektedir. Sublitik kon-santrasyonlarda PVL'nin altı saat içinde nötrofillerde apoptozu indüklediği, yüksek kon-santrasyonunda ise bir saat içinde hücre parçalanmasına neden olduğu bildirilmiştir^{2,3}.

Blaine ve arkadaşları³⁴ yoğun bakım ünitelerinde yaptıkları çalışmada; PVL pozitif hastaların %39'unda bakteriyemi, %23'ünde mortalite bildirmişlerdir. Chiu ve arkadaşları³⁵ enfeksiyon etkeni olarak izole edilen MSSA suşlarında %20 oranında PVL pozitifliği saptamışlar, hastalarda ateşin anlamlı derecede daha uzun sürdüğünü ve C-reaktif protein düzeylerinin PVL-negatif *S.aureus* enfeksiyonu olan hastalara göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ne olursa olsun, yatan hastalarda PVL pozitif ve TK olduğu düşünülen *S.aureus* suşlarını görmek endişe vericidir. Lina ve arkadaşları⁸ izole etikleri *S.aureus* suşlarının %37'sinde, TK-MRSA suşlarının ise %85'inde PVL geni tespit etmişler; PVL pozitif olarak saptadıkları *S.aureus* suşlarının en sık fronküllerden izole edildiğini bildirmişlerdir.

S.aureus'un çeşitli çalışmalarda; TK pnömonilerin %8-68'inden, HK pnömonilerin ise %18'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir. PVL negatif *S.aureus* ile enfekte pnömoni hastalarının ölüm oranı %6 iken, PVL pozitif *S.aureus*'lar ile enfekte pnömoni hastalarının ölüm oranı %32 olarak bildirilmiştir³⁶. Kreienbuehl ve arkadaşları³⁷ PVL pozitif *S.aureus* suşlarıyla enfekte pnömoni hastalarında %41 oranında mortalite tespit etmişler, hastanın kabulünden ölüme kadar geçen ortalama süreyi 20 saat olarak bildirmişlerdir. Li ve arkadaşları³⁸ nekrotizan pnömoni fatal bir olguda, PVL ve toksik şok sendromu toksini-1'i beraber salgılayan MSSA suşu saptamışlardır. Bu bulgular hipervirülen *S.aureus* izolatlarının tüm dünyada yayılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. PVL pozitif *S.aureus* suşlarına karşı hızlı ve etkin olarak, enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında uygulanması sağlanarak hastane ortamında yayılmaları ve bu suşların seleksiyonu önlenmelidir. Toplum ve hastane kökenli *S.aureus* izolatlarına bağlı gelişen enfeksiyonlarda, tedavinin düzenlenmesi ve komplikasyon gelişiminin önlenmesi için PVL pozitif MRSA ve MSSA izolatlarının dikkatlice izlenmesi gerekmektedir. Yapılacak surveyans çalışmaları, *S.aureus* suşlarının moleküler ve mikrobiyolojik analizi; TK ve HK-*S.aureus* suşlarının epidemiyolojisi, evrimi ve toksinlerinin konak yanıtı üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında, ayrıca hipervirülen suşların gelişimine karşı gerekli tedbirlerin alınmasında yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), pp: 2069-92. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, Churchill Livingstone, New York.
2. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog 2010; 6(1): e1000715.
3. Prévost G, Mourey L, Colin DA, et al. Staphylococcal pore-forming toxins. Curr Top Microbiol Immunol 2001; 257: 53-83.
4. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002; 359(9308): 753-9.
5. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest 2007; 87(1): 3-9.
6. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 616-87.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th Informational Supplement, M100-S17, 2007. CLSI, Wayne, PA.
8. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin- producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29(5):1128-32.
9. Merlino J, Watson J, Rose B, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother 2002; 49(5): 793-801.
10. Durmaz R, Köksal F, Hoşoğlu S ve ark. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler tiplendirmesinde kullanılacak "Pulsed Field Gel Electrophoresis "(PFGE) yöntemlerinin standardizasyonu ve kit formatı haline getirilmesi. TÜBİTAK Proje No: 106S211 (SBAG-3459), 2009, Ankara.
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-9.
12. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001; 7(2): 178-82.
13. Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, et al. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. Ann Emerg Med 2009; 53(3): 358-65.
14. Köck R, Becker K, Cookson B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Euro Surveill 2010; 15(41): 19688.
15. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H. Metisilin dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. İnfeksiyon Derg 2007; 21(4): 187-91.
16. Ardoğan A, Atasever L, Bal C. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34(1): 20-3.
17. Ekşi F, Balcı İ, Gayyurhan ED. Klinik örneklerimizden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirilmesi. İnfeksiyon Derg 2007; 21(1): 27-31.
18. Duman Y, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların antimikrobiyallere direnç durumu. İnönü Üni Tıp Fak Derg 2009; 16(3): 145-8.
19. Health Protection Agency. PLV-*Staphylococcus aureus* infections: an update. Health Protection Report 2011; 5(7): news. Available from: <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011/news0711.htm#pvl>
20. Chini V, Petinaki E, Foka A, et al. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. Clin Microbiol Infect 2006; 12(1): 29-34.
21. Baba Moussa L, Sanni A, Dagnra AY, et al. Epidemiology of antibiotic susceptibility and leucotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates in West Africa. Med Mal Infect 1999; 29(11): 689-96.
22. Zetola N, Francis JS, Nuernberger EL, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. Lancet Infect Dis 2005; 5(5): 275-86.
23. Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Pantone-Valentine lökositidin (PVL) varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2007; 41(3): 357- 62.
24. Şimşek M. Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında Pantone-Valentine Lökosidin virülans faktörünün moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, 2010. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
25. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, et al. Investigation of Pantone-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. Microb Drug Resist 2008; 14(3): 203-10.
26. Akoğlu H, Zarakolu P, Altun B, Ünal S. Epidemiological and molecular characteristics of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Hacettepe University Adult Hospital in 2004-2005. Mikrobiyol Bul 2010; 44(3): 343-55.
27. Öksüz L, Gürler N, Güner S ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında Pantone-Valentine Lökosidin (PVL) varlığının araştırılması: Ön çalışma. 23. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, 28 Mayıs-01 Haziran 2008, İzmir.

28. Baran CB, Mutlu D, Baysan BO, et al. Investigation of Panton-Valentine leukocidin gene, SCCmec gene cassette types and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from outpatients. Mikrobiyol Bul 2010; 44(4): 533-45.
29. Yılmaz S, Kılıç A, Karagöz A, Bedir O, Uskudar Güçlü A, Başustaoğlu AC. Investigation of various virulence factors among the hospital and community-acquired *Staphylococcus aureus* isolates by real-time PCR method. Mikrobiyol Bul 2012; 46(4): 532-45.
30. Gülmez D, Sancak B, Ercis S, Karakaya J, Hasçelik G. Investigation of SCCmec types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 341-51.
31. Kirdar S, Arslan U, Tuncer I, Findik D, Bozdoğan B. Investigation of the clonality and Panton-Valentine leukocidin toxin among nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Mikrobiyol Bul 2009; 43(4): 529-33.
32. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı I, Akan OA, Karahan ZC. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures between 2002-2005 in Ankara University Hospital. Mikrobiyol Bul 2009; 43(1): 1-10.
33. Eryonar B. *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-Valentin Lökosidin varlığının polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2008. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
34. Blaine KP, Tuohy MJ, Wilson D, et al. Progression to bacteremia in critical care patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing Panton-Valentine leukocidin. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68(1): 28-33.
35. Chiu YK, Lo WT, Wang CC. Risk factors and molecular analysis of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization and infection in children. J Microbiol Immunol Infect 2012; 45(3): 208-13.
36. DeRyke CA, Lodise TP, Rybak MJ, et al. Epidemiology, treatment and outcomes of nosocomial bacteremic *Staphylococcus aureus* pneumonia. Chest 2005; 128(3): 1414- 22.
37. Kreienbuehl L, Charbonney E, Eggimann P. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. Ann Intensive Care 2011; 1(52): 1-7.
38. Li Z, Stevens DL, Hamilton SM, et al. Fatal *S.aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. PLoS One 2011; 6(11): e27246.