

Yedi Yıllık Sürede Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında *mecC* ve Panton-Valentine Lökosidin Gen Varlığının Araştırılması

Investigation of the Presence of *mecC* and Panton-Valentine Leukocidin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens During Seven Years Period

Abdullah KILIÇ¹, Eyüp DOĞAN¹, Sinem KAYA¹, Mehmet BAYSALLAR¹

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

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

Geliş Tarihi (Received): 19.03.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.06.2015

ÖZ

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'un saptanması ve tanımlanması, uygun tedavi seçimi ve epidemiyolojik verilerin elde edilmesi için önemlidir. *mecC* geni, *mecA* genine yaklaşık %69 DNA benzerliği gösteren bir *mecA* homologudur ve PBP2a/2' proteinine yaklaşık %63 benzerlik gösteren proteini kodlamaktadır. Çeşitli çalışmalar, *mecC* pozitif MRSA izolatlarının, çapraz kontaminasyon ile çiftlik hayvanlarından insanlara bulaştığını desteklemektedir. Panton-Valentine lökosidini (PVL) ise, *S.aureus*'un potent sitotoksini olup, önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarında *mecC* ve *pvl* gen varlığının ve prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ocak 2007-Aralık 2014 tarihleri arasında hastanemizde izole edilmiş olan 1177'si metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ve 523'ü MRSA olmak üzere toplam 1700 *S.aureus* izolatı dahil edilmiştir. İzolatlar, konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostic Instrument Systems, ABD) ile tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi, oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI standartlarına göre yapılmıştır. *mecA* gen varlığı gerçek zamanlı PCR; *pvl* ve *mecC* gen varlığı ise konvansiyonel PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Suşların izole edildiği hastaların %44.6 (759/1700)'sı poliklinik hastası ve %65.8 (1119/1700)'i erkek olup, yaş ortalaması 39.7 yıldır. Çalışmamızda değerlendirilen 1700 izolatin 523 (%30.7)'ünde *mecA* geni pozitif bulunmuş; hiçbir izolatta *mecC* geni tespit edilmemiştir. MSSA izolatlarının %1.9 (23/1177)'u ve MRSA izolatlarının %1.7 (9/523)'inde olmak üzere, toplam 32 (%1.8) izolatta *pvl* geni pozitif bulunmuştur. PVL pozitif *S.aureus*'ların %56.2 (18/32)'sinin, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu örneklerinden izole

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Abdullah Kılıç, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etilik, 06010, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 304 3412, E-posta (E-mail): abkili@gata.edu.tr

edildiği belirlenmiştir. Saptanan PVL pozitiflik oranı, ülkemizde daha önce yapılan çalışmalar ile benzer bulunmuştur. Bu çalışma, ulaşılabilen kaynaklara göre, ülkemizde *mecC* tespiti ile ilgili olarak yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda, *mecC* geni taşıyan *S.aureus* izolatı saptanmamış olsa da, bölgesel epidemiyolojik verilerin hızla değişebileceği göz ardı edilmemelidir. Sonuç olarak, ülkemizde *mecC* geninin araştırılmasına yönelik, hayvan izolatlarının da tarandığı çok merkezli çalışmalara gerek olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; *mecA* geni; *mecC* geni; Panton-Valentine lökositini.

ABSTRACT

Detection and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical microbiology laboratories are important for the selection of appropriate treatment and obtaining epidemiological data. *mecC* gene, is a *mecA* homologue, showing almost 69% DNA similarity with the *mecA* gene and the encoded protein by this gene shows almost 63% similarity with the PBP2a/2' protein. Several studies indicated that *mecC* positive MRSA strains can be transmitted from the livestock to humans by cross contamination. Panton-Valentine leukocidin (PVL), a potent cytotoxin of *S.aureus* is also considered as an important virulence factor. The aim of this study was to determine the existence and prevalence of *mecC* and *pvl* genes among *S.aureus* strains isolated from clinical specimens. A total of 1700 *S.aureus* isolates including 1177 methicillin-susceptible *S.aureus* (MSSA) and 523 MRSA, isolated in our hospital between January 2007 to December 2014, were included in the study. The isolates were identified by both conventional methods and BD Phoenix automated system (BD Diagnostic Instrument Systems, USA). Antibiotic susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer disk diffusion method with oxacillin (1 µg) and cefoxitin (30 µg) according to the CLSI standards. The presence of *mecA* gene was investigated by the use of real-time PCR, and the presence of *pvl* and *mecC* genes were detected by conventional PCR method. Among the patients, 44.6% (759/1700) were outpatients, 65.8% (1119/1700) were male and the mean age of patients was 39.7 years. Of 1700 isolates evaluated in this study, 523 (30.7%) were positive for *mecA* gene, however all of them were negative for *mecC* gene. A total of 32 (1.8%) isolates were positive for *pvl* gene including 23 (1.9%) out of 1177 MSSA and nine (1.7%) out of 523 MRSA strains. Eighteen (56.2%) of the PVL-positive *S.aureus* strains were isolated from skin and soft tissue infections. The frequency of PVL detected in this study was similar to the data of previous studies in our country. To the best of our knowledge, this is the first study for the determination of the *mecC* in our country. Although the *mecC* gene positive *S.aureus* has not been detected in our study, it should be kept in mind that the regional epidemiological conditions can vary quickly. In conclusion, multicenter studies are needed for the screening of *mecC* gene including the animal isolates, in Turkey.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; *mecA* gene; *mecC* gene; Panton-Valentine leukocidin.

GİRİŞ

Güney Batı İngiltere'de sığır mastiti ile ilgili yapılan bir çalışmada süt tankından alınan bir örnekte fenotipik olarak oksasilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatı tanımlanmıştır¹. Ancak doğrulama için yapılan testlerde *mecA* geni taşımadığı ve PBP2a/2' aglütinasyon testinin negatif olduğu görülmüş ve izolat LGA251 olarak isimlendirilmiştir. LGA251 izolatının yapılan genom dizi analizinde, klasik *mecA* genine yaklaşık %69 benzerlik gösteren bir *mecA* homoloğu taşıdığı (*mecA*_{LGA251}), bu genin PBP2a/2' proteinine ise yaklaşık %63 benzerlik gösteren proteini kodladığı tespit edilmiş ve 2012 yılında *mecC* olarak isimlendirilmiştir¹.

Panton-Valentine lökosidini (PVL), toplum kaynaklı MRSA'larda sık olarak bulunan bir virülans faktörüdür. PVL ile ilişkili enfeksiyonlar, öncelikle deri ve yumuşak dokuda başlamakta, enfeksiyon daha sonra akciğerlere yayılmakta, nekrotizan pnömoni tablosu oluşturmakta ve akciğer dokusunu harap ederek olguların %75'inde ölümlerle sonuçlanmaktadır². Bu çalışmada, 2007-2014 yılları arasında hastanemizde izole edilmiş olan *S.aureus* izolatlarında, *mecC* ve *pvl* gen varlığının ve prevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar

Çalışmaya, Ocak 2007-Aralık 2014 tarihleri arasındaki yedi yıllık dönem içerisinde, kliniklerde yatan ve polikliniklere başvuran hastalardan gönderilen örneklerden izole edilmiş olan 1177'si metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ve 523'ü MRSA olmak üzere toplam 1700 izolat dahil edildi. *S.aureus* üremesi olan hastalara ait demografik veriler (yaş ve cinsiyet), klinik örneğin alındığı yer ve tarihe ait bilgiler kayıt sistemimizden temin edildi. Suşlar, izole edildikleri tarihte öncelikle konvansiyonel yöntemler, sonrasında BD Phoenix otomatize sistem (Becton Dickinson Diagnostic Systems, ABD) ile tanımlanmış ve %10'luk skim milk solüsyonunda -80°C'de saklanmıştı. İzolatların 594 (%34.9)'ü deri ve yumuşak doku, 504 (%29.6)'ü solunum yolu, 274 (%16.1)'ü kan, 252 (%14.8)'si idrar ve 76 (%4.4)'sı diğer örneklerden (kateter, göz sürüntü örneği gibi) izole edilmişti. Suşların izole edildiği hastaların 759 (%44.6)'u poliklinik hastası ve 1119 (%65.8)'u erkek olup, yaş ortalaması 39.7 yıldır.

Çalışmada kontrol suşu olarak; *S.aureus* NCTC 10442 (*mecA* pozitif), *S.aureus* N315 (*mecA* pozitif), *S.aureus* ATCC 29213 (*mecA* negatif), *S.aureus* ATCC 25923 (*pvl* pozitif) ve *mecC* geni pozitif *S.aureus* [Prof. Anders Rhod Larsen (Statens Serum Institut, Danimarka)'den temin edildi] kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testi, oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI standartlarına göre yapıldı³. İnhibisyon zon çapları sefoksitin için ≤ 19 mm ve oksasilin için ≤ 10 mm olan suşlar metisiline dirençli olarak kabul edildi. Ayrıca PVL pozitif bulunan izolatların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI standartlarına göre yapıldı ve değerlendirildi³.

pvl, *mecA* ve *mecC* Genlerinin Saptanması

İzolatların DNA izolasyonu, kaynatma metodu kullanılarak yapıldı. *mecA* gen varlığı, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Kılıç ve arkadaşlarının⁴; *pvl* ve *mecC* gen varlığı ise konvansiyonel PCR yöntemi ile Stegger ve arkadaşlarının⁵ çalışmalarındaki gibi araştırıldı. Çalışmada sadece *pvl* ve *mecC* gen bölgelerini tespit etmek için gerekli olan primerler kullanıldı. PCR döngüleri 94°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyonu, takibinde 30 döngü 94°C'de 30 saniye, 59°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve son olarak 72°C'de 10 dakika son uzama olacak şekilde ayarlandı.

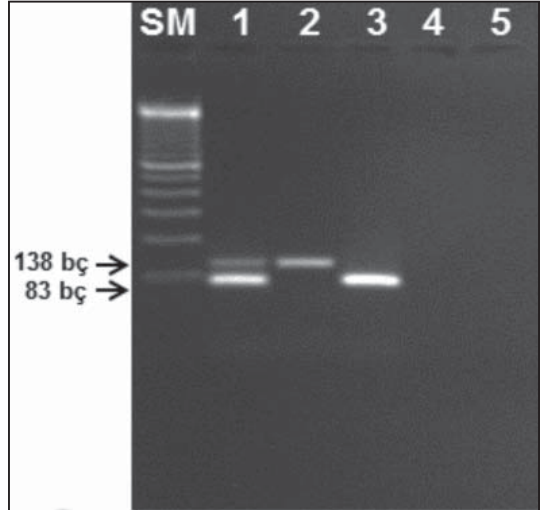
BULGULAR

Gerçek zamanlı PCR ile suşların 523 (%30.7)'ünde *mecA* geni pozitif olarak tespit edilmiş; bu izolatlar, fenotipik olarak da oksasilin ve sefoksitine dirençli bulunmuştur. Toplam 1700 izolatin hiçbirisinde *mecC* geni saptanmamıştır (Şekil 1). *mecA* ve *mecC* geni tespit edilmeyen izolatların hepsinin oksasilin ve sefoksitine duyarlı olduğu belirlenmiştir. MSSA izolatlarının %1.9 (23/1177)'ünde, MRSA izolatlarının ise %1.7 (9/523)'ünde olmak üzere, toplam 32 (%1.8) izolatta *pvl* geni pozitif bulunmuştur. Bu 32 suşun 31 (%96.8)'i ayaktan başvuran hastaların örneklerinden izole edilmiştir. PVL pozitif *S.aureus*'ların 18 (%56.2)'i deri ve yumuşak doku, 9 (%28.1)'u solunum yolu, 3 (%9.3)'ü kan ve 2 (%6.2)'si idrar örneklerinden izole edilen suşlardır. Bu izolatların hepsi (n= 32) linezolid ve vankomisine duyarlı iken, 13 (%40.6)'ü eritromisine; 9 (%28.1)'u metisilin, tetrasiklin ve klindamisine; 7 (21.8)'si rifampin ve levofloksasine; 2 (%6.2)'si ise trimetoprim-sülfa-metoksazole dirençli bulunmuştur.

TARTIŞMA

mecC MRSA izolatları oksasiline duyarlı veya orta düzey duyarlı olabileceğinden, fenotipik yöntemler ile MSSA olarak yanlış tanımlanabilmektedir. Disk difüzyon, sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemlerinde sefoksitin, oksasiline göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir; ancak farklı ticari sistemlere ait agarlara bağlı olarak sonuçlar değişebilmektedir⁶. Fenotipik yöntemlerin *mecC* tespitindeki yetersizliğinden dolayı, DNA temelli yöntemlerin *mecC* tespitinde etkili olduğu düşünülmektedir⁷.

Klasik *mecA* dışında, *mecC* içeren MRSA izolatlarının rutinde güvenilir bir şekilde tespit edilmesi, uygun hastane kontrol önlemlerinin alınması ve tedavi protokolünün planlanması için önemlidir⁷. Birçok epidemiyolojik çalışma yapılmasına rağmen, *mecC* geninin kökeni tam olarak anlaşılamamıştır. Kesin olmamakla birlikte, yapılan birçok çalışma, *mecC* MRSA izolatlarının çapraz kontaminasyon ile çiftlik hayvanlarından insanlara bulaşmış olabileceğini desteklemektedir⁸. *mecC* MRSA'nın gerçek dağılımını gösteren çalışmalar nadirdir ve çoğu retrospektif olarak yapılmıştır. Danimarka'da 2003-2011 yılları arasında yapılan bir çalışmada, *mecC* oranının %1.5 olduğu ve yıllar içinde artış gösterdiği bildirilmiştir⁹. Almanya'da 2004-2005 yıllarında toplanan 1604, 2010-2011 yılları arasında toplanan 1603 MRSA çalışılmış ve



Şekil 1. *S.aureus* suşlarının PCR sonuçları. SM: Moleküler ağırlık belirteci; Hat 1: *mecC* ve *pvl* geni içeren karışık *S.aureus* izolatları; Hat 2: *mecC* pozitif *S.aureus*; Hat 3: *pvl* pozitif *S.aureus*; Hat 4: *mecC* ve *pvl* negatif *S.aureus*; Hat 5: Negatif su kontrol (bç: Baz çifti).

her iki dönemde de sadece birer izolatin *mecC* pozitif olduğu (%0.06) bulunmuştur¹⁰. İsviçre’de 2005-2011 yılları arasında izole edilen 80 MRSA izolatında¹¹, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde 50 yaralı asker personelden izole edilmiş 102 MRSA izolatında¹² ve İngiltere’de 2012-2013 yılları arasında toplanan toplam 500 *S.aureus*’un hiçbirinde *mecC* varlığı saptanmamıştır¹³. Çalışmamızda 2007-2014 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 1177 MSSA, 523 MRSA örneği çalışılmış ve *mecC* geni tespit edilmemiştir. Bu bize, hastanemizin henüz *mecC* açısından risk altında olmadığını göstermektedir.

Panton-Valentine lükosidini, *S.aureus*’ların önemli bir virülans faktörü olarak bilinmektedir. PVL taşıyan *S.aureus*’lar ciddi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, nekrotizan fasiit ve hemorajik pnömoni gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olmaktadır². Fransa’da 77 MRSA’da %33.8¹⁴, İsviçre’de 47 MRSA’da %59.5¹⁵ ve Almanya’da 19 MRSA’da %63, 93 MSSA’da %45¹⁶ oranlarında PVL pozitiflikleri bildirilmiştir. ABD’de yapılan bir çalışmada ise, çalışılan tüm *S.aureus* izolatları PVL pozitif olarak bulunmuştur¹⁷. Meksika’da¹⁸ 291 *S.aureus* ve İran’da¹⁹ 296 *S.aureus* ile yapılan çalışmalarda ise PVL pozitif izolat tespit edilmemiştir. Türkiye’de yapılan çalışmalarda bu oran %0 ile %4 arasında değişmektedir^{4,20-23}. Çalışmamızda, ülkemizdeki çalışmalara benzer olarak, 523 MRSA izolatının dokuzu (%1.7) ve 1177 MSSA izolatının 23 (%1.9)’ü PVL pozitif olarak bulunmuştur. PVL, çoğunlukla deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen suşlarda pozitif olarak tespit edilmektedir^{14,15}. Çalışmamızda, PVL pozitif izolatların %56.2 (18/32)’si deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda *mecC* pozitif *S.aureus* izolatı tespit edilmemiştir. Ancak bölgesel epidemiyolojik değişikliklerin hızlı olabileceği göz ardı edilmemelidir. PVL pozitiflik oranı ABD, Avrupa ve Afrika ülkeleri ile kıyaslandığında ülkemizde düşüktür. *S.aureus*’un önemli bir virülans faktörü olan PVL’nin zaman içindeki değişimlerinin takip edilmesi, epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in livestock in Spain. J Clin Microbiol 2014; 52(11): 4067-9.
2. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002; 359(9308): 753-9.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement. CLSI M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
4. Kilic A, Muldrew KL, Tang YW, Basustaoglu AC. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 66(4): 349-55.
5. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*(LGA251). Clin Microbiol Infect 2012; 18(4): 395-400.
6. Skov R, Larsen AR, Kearns A, et al. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. J Antimicrob Chemother 2014; 69(1): 133-5.

7. Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S.aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* 2014; 304(7): 794-804.
8. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med* 2013; 5(4): 509-15.
9. Petersen A, Stegger M, Heltberg O, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(1): E16-22.
10. Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, et al. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J Clin Microbiol* 2012; 50(10): 3186-92.
11. Basset P, Prod'homme G, Senn L, Greub G, Blanc DS. Very low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J Hosp Infect* 2013; 83(3): 257-9.
12. Ganesan A, Crawford K, Mende K, et al. Evaluation for a novel methicillin resistance (*mecC*) homologue in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from injured military personnel. *J Clin Microbiol* 2013; 51(9):3073-5.
13. Saeed K, Ahmad N, Dryden M, et al. Oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA), a hidden resistant mechanism among clinically significant isolates in the Wessex region/UK. *Infection* 2014; 42(5): 843-7.
14. van der Mee-Marquet N, Poisson DM, Lavigne JP, et al. The incidence of *Staphylococcus aureus* ST8-USA300 among French pediatric inpatients is rising. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(5): 935-42.
15. Seidl K, Leimer N, Palheiros Marques M, et al. USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland between 2001 and 2013. *Int J Med Microbiol* 2014; 304(8): 1118-22.
16. Waldenburger S, Vogel U, Goebeler M, Kolb-Mäurer A. Community-acquired skin infections caused by *Staphylococcus aureus*: what is the role of the Pantone-Valentine leukocidin toxin? *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12(1): 59-66.
17. Dozois A, Thomsen I, Jimenez-Truque N, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among skin and soft tissue infections in an emergency department in Guyana. *Emerg Med J* 2014; pii: emermed-2013-203373. [Epub ahead of print].
18. Borbón-Esquer EM, Villaseñor-Sierra A, Martínez-López E, Jáuregui-Lomeli JJ, Villaseñor-Martínez R, Ruiz-Briseño Mdel R. SCCmec types and *pvl* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from children hospitalized in a tertiary care hospital in Mexico. *Scand J Infect Dis* 2014; 46(7): 523-7.
19. Rezaei M, Moniri R, Mousavi SG. Molecular analysis and susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in emergency department patients and related risk factors in Iran. *J Hosp Infect* 2015; 89(3): 186-91.
20. 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.
21. Gülmez D, Sancak B, Ercis S, Karakaya J, Haşçelik G. Investigation of SCCmec types and Pantone-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.
22. Bozdoğan B, Yıldız O, Oryaşın E, et al. t030 is the most common spa type among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Turkish hospitals. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(4): 571-81.
23. Yılmaz S, Kılıç A, Karagöz A, et al. 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.