
Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*'ların Arbitrarily Primed PCR ve Plazmid Profil Analizi ile Değerlendirilmesi

Özgül KISA*, Ahmet BAŞUSTAOĞLU*, Mustafa ÖZYURT*, Tunçer HAZNEDAROĞLU*

* Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada; hastanemizin Genel Cerrahi, Ortopedi ve Travmatoloji ile Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi kliniklerinde yatarak tedavi gören 30 hastadan Haziran-Aralık 1997 tarihleri arasında hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve tanımlanan 30 metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatu "arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR)" ve plazmid profil analizi (PPA) yöntemleriyle moleküler olarak tiplendirilmiştir.

Hastalardan infeksiyon etkeni olarak izole edilen 30 MRSA izolatu AP-PCR yöntemi ile bant paternlerine göre yedi grupta (I. grupta: 13, II. grupta: 10, III. grupta: 2, IV. grupta: 2, V. grupta: 1, VI. grupta: 1 ve VII. grupta: 1), PPA yöntemi ile ise plazmid profiline göre üç grupta (A grubunda: 22, B grubunda: 3, C grubunda: 5) toplanmıştır. Çalışma sonucunda ilgili kliniklerdeki hastalardan elde edilen izolatların, özellikle I. ve II. grup ile A grubunda (sırasıyla AP-PCR %77, PPA %73) yer aldığı belirlenmiş ve bu izolatların hastanemizde hastane infeksiyonlarına en sık neden olan kökenler olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, Plazmid profil analizi, Arbitrarily primed-polymerase chain reaction

SUMMARY

The Evaluation of the *Staphylococcus aureus* Strains by Using Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction and Plasmid Profile Analysis Techniques

A total of 30 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains were isolated as nosocomial pathogens from patients hospitalized in General Surgery, Orthopedics and Reconstructive Surgery Departments from June 1997 through December 1997. These strains were evaluated by molecular typing methods using arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR) and plasmid profile analysis (PPA).

By using AP-PCR method, these isolates on the basis of their band patterns were divided into seven groups (I through VII) in which each group had reciprocal number of isolates by thirteen, ten, two, two, one, one and one, respectively. By PPA, these isolates were grouped into three divisions as group A, B and C and each was represented by twentytwo, three and five isolates respectively. It was found that as nosocomial pathogens group I and II (77%) are frequently encountered for AP-PCR, while group A for PPA (73%) dominated.

Key Words: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Plasmid profile analysis, Arbitrarily primed-polymerase chain reaction

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları ilk olarak 1961 yılında rapor edilmiştir^[1]. MRSA günümüzde tüm dünyada hastaneden kazanılmış infeksiyon etkenleri arasında önemli ve önemi de gittikçe artan bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır^[2-6]. Etken primer olarak infekte ya da kolonize hastalar ve hastane personeli aracılığı ile taşınmaktadır^[7-10]. Hastane ortamında MRSA infeksiyonlarının sayısının azaltılması ve hastalara bulaşın önlenmesi, sözkonusu infeksiyonlarla savaşta önemli hedeflerdir. Bu amaçla salgınların epidemiyolojisinin incelenmesi ve yayılım yollarının tanımlanabilmesi için MRSA türlerinin birbirinden ayırt edilmesi gerekmektedir^[2,11].

Hastane içinde MRSA'nın klonal yayılma eğilimi klinik izolatlarda özgül tiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Ancak MRSA kökenleri arasında yüksek derecedeki genetik yakınlık nedeniyle özellikle sadece rutin bakteriyolojik yöntemleri kullanan pek çok hastane laboratuvarı için bu ayırım güç olabilir^[8].

MRSA'ları tiplendirmek için epidemiyolojik amaçlı yapılan çalışmalarda antibiyotiplendirme, biyotiplendirme, faj tiplendirmesi, plazmid profil analizi (PPA), elektroforetik protein profilleri, restriksiyon endonükleaz enzimi, "pulsed field" jel elektroforezi, ribotiplendirme, "arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR)" gibi fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır^[12].

Tenover ve arkadaşları tiplendirme, tekrarlanabilirlik, ayırt edici güç, kullanım ve yorumlama kolaylığı yönünde 12 değişik tiplendirme yöntemini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak hiçbir tiplendirme yönteminin tek başına birbirinden bağlantısız MRSA kökenlerini ayırt etmeye yetmediğini, iki yöntemin kombinasyonu ile daha iyi sonuçlar elde edilebileceğini vurgulamışlardır^[3].

Hastane infeksiyon kontrol komitesince gerçekleştirilen süreyans çalışmalarında üç kliniğimizde ortalama altı aylık bir dönem içerisinde MRSA infeksiyonlarında bir artış saptanmıştır. Bu nedenle bu kliniklerde belirtilen dönem içerisinde yatan hasta örneklerinden izole edilen MRSA izolatları çalışmaya alınmıştır. Çalışmada bu üç farklı üniteden elde edilen verilerin tüm hastane ortamını yansıtmayacağı gerçeği ile birlikte MRSA suşları ile ileride yapılacak çalışmalar için bir veri tabanı oluşturulabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, çalışmamızda altı aylık döneme ait MRSA izolatları AP-PCR ve PPA yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak epidemiyolojik açıdan incelemeye alınmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bakteriler

16 Haziran 1997-29 Aralık 1997 tarihleri arasında hastanemizin genel cerrahi, ortopedi ve travmatoloji, plastik ve rekonstrüktif cerrahi kliniklerinde yatmakta olan hastalardan alınan çeşitli örneklerden izole edilen 30 MRSA izolatu çalışmaya alındı (Tablo 1). Her biri farklı hastalara ait olan izolatlar %5 koyun kanlı agardaki tipik koloni görünümüleri, Gram boyama, katalaz, koagülaz, mannitol fermentasyonu ve DNaz testleri yönünden incelenerek tanımlandı^[13,14]. Metisilin direnci "Mueller-Hinton" agarda disk difüzyon yöntemiyle 1 µg oksasilin diski kullanılarak "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)" önerileri doğrultusunda çalışıldı^[15]. İzolatların tamamında oksasilin zon çapı ≤ 10 mm olarak saptandı. Intermediate izolat olmadığından oksasilin tuzlu agar çalışmada kullanılmadı. Disk difüzyon testlerinde kalite kontrol amacıyla standart suş olarak *S. aureus* ATTC 25923 kullanıldı.

Plazmid Ekstraksiyonu

Bakteriler ayrı ayrı 30 mL "Luria Bertoni Broth (bacto trytone %1, bacto yeast extract %0.5, NaCl %1, pH: 7.5)" içine ekimleri yapılarak 37°C'de aerobik ortamda inkübe edildi. Altıbin rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen bakteri pelletleri, üzerine 1.0 mL "TE buffer [10 mM Tris (pH= 7.5), 0.1 mM disodium EDTA]" ilave edilerek bir kere yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Pellet üzerine içinde lizostafin (50 µg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) bulunan "TE buffer"dan 200 µL konularak süspansiyon edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Buna 400 µL 0.2 M NaOH-%1 "sodium dodecyl sulfate (SDS)" ilave edildi. On dakika bekledikten sonra 200 µL potasyum asetat ilave edilip süspansiyon 10 dakika buzda bekletildi. Onikibin rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 1 mL fenol kloroform (25:24:1) ile ekstrakte edildi ve DNA 3 volüm etil alkol ile presipite edildi^[9].

DNA Ekstraksiyonu

Tüm MRSA izolatları ayrı ayrı "Mueller-Hinton" sıvı besiyerine ekimleri yapılarak 37°C'de aerobik ortamda inkübe edildi. Bakteri süspansiyonlarının 1.5 mL'si steril koşullarda mikrosantrifüj tüplerine aktararak 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak elde edilen bakteri pelletleri üzerine 50 µL lizostafin (100 µg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bunun üzerine 50 µL proteinaz K (100 µg/mL) ve 150 µL buffer (0.01 M Tris pH:

7.8, 0.005 M EDTA, %0.5 SDS) eklenip 37°C'de 10 dakika daha inkübe edildikten sonra kaynar su içinde 5 dakika kaynatıldı. Ondörtbin rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı yeni bir ependorf tüpe alındı ve -20°C'de saklandı^[16].

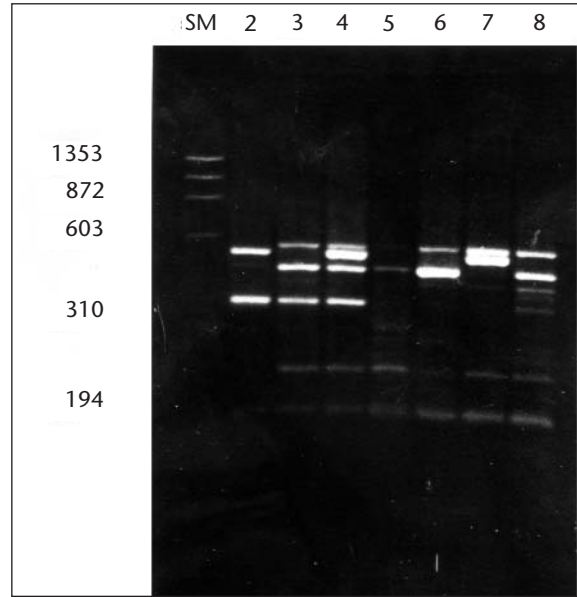
AP-PCR

Elde edilen bakteri DNA'ları AP-PCR için HCVP (5' GGG AGA GCC ATA GTG GTC TG 3' ve 5' ATG GCG TTA GTA TGA GTG TC 3') primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Primerlerin tekrarlanabilirlik özelliklerinin kanıtlanması amacıyla AP-PCR testleri beş kez çalışıldı. Amplifikasyonda her tüpte 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH: 8.3), %0.1'lik Triton X-100, 2.0 mM MgCl₂, 4 µL dNTP mix (10 mM), 5 U Taq polimeraz enzimi (GATA), 50 pmol primer olacak şekilde hazırlandı^[12,16,17]. Daha sonra amplifikasyon aşamasına geçildi. Amplifikasyonun spesifikliği iki farklı şekilde uygulanan "annealing" ısılarıyla artırıldı. Bu amaçla 94°C'de 30 saniye ayrılma (denatürasyon), 50°C'de 30 saniye birleşme (annealing), 72°C'de uzama (extention) (3 siklus) ve 94°C'de 30 saniye ayrılma (denatürasyon), 50°C'de 30 saniye birleşme (annealing), 72°C'de uzama (extention) (40 siklus) programı uygulandı. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin 20 µL'si %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole transilüminatör üzerinde incelenerek fotoğrafları çekildi. AP-PCR çalışmasında bir adet metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve bir adet metisiline dirençli *S. epidermidis* (MRSE) kalite kontrol amacıyla diğer izolatlarla beraber kullanıldı.

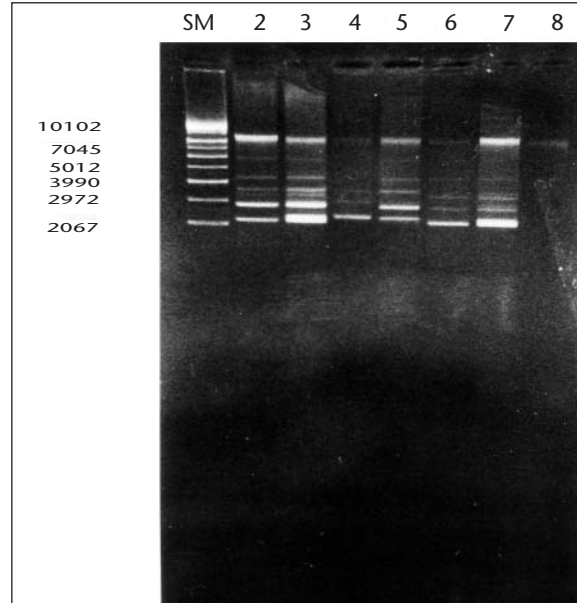
BULGULAR

Hastanemizin üç kliniğinde yatmakta olan hastalardan altı aylık süre içinde 30 MRSA suşu izole edilmiştir. AP-PCR yöntemi MRSA izolatlarını bant paternlerine göre yedi grupta (I. grupta: 13, II. grupta: 10, III. grupta: 2, IV. grupta: 2, V. grupta: 1, VI. grupta: 1 ve VII. grupta: 1) toplanmıştır. Tekrarlanan her çalışmada aynı bant paternleri elde edilmiştir. Her gruptan bir izolatın AP-PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin jel resmi Resim 1'de görülmektedir.

PPA yöntemi ise izolatları plazmid profillerine göre üç grupta (A grubunda: 22, B grubunda: 3, C grubunda: 5) toplanmıştır. Resim 2'de MRSA izolatlarının plazmidlerinin jel resmi gösterilmiştir. AP-PCR yöntemi ile I. gruptaki 9, II. gruptaki 10, III. gruptaki 2 ve VII. gruptaki 1 izolat PPA yönteminde A grubu içinde yer alırken plazmid saptanmayan (C grubu) 4 izolat AP-PCR yönteminin I. grubunda sınıflandırılmıştır. İki izolat (17-18) her iki yöntemle de diğer izolatlardan farklı bir grup içinde (AP-PCR'da



Resim 1. AP-PCR yöntemi ile farklı izolatlardan elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonucundaki bant paternleri. Kolon 1: Size marker (ϕ X 174/Hae III. Marker); Kolon 2-8: Farklı bant paterni gösteren izolatlar



Resim 2. MRSA izolatlarından ekstrakte edilen plazmid DNA'larının jel elektroforezi. Kolon 1: Size marker (Supercoiled DNA Ladder); Kolon 2, 3, 5: A grubundaki izolatlar; Kolon 4, 6, 7: B grubundaki izolatlar; Kolon 8: Plazmid ekstrakte edilmeyen C grubundaki izolatlar

IV. grup, PPA'da B grubu) saptanmıştır. Yine AP-PCR yöntemi ile V., VI. ve VII. grupta tek başına yer alan 3 izolat PPA yönteminde sırasıyla C, B, A gruplarında yer almıştır (Tablo 1).

Tablo 1. MRSA izolatlarının mikrobiyolojik ve epidemiyolojik özellikleri

İzolat No	Tarih	Örnek cinsi	Klinik	AP-PCR	PPA
1	16.06.1997	Cerrahi yara	Genel cerrahi	II	A
2	19.06.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	II	A
3	20.06.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	A
4	28.06.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	A
5	30.06.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	A
6	30.06.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	C
7	08.07.1997	Kateter yeri	Genel cerrahi	II	A
8	09.07.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	C
9	15.07.1997	Transtrakeal aspirat	Genel cerrahi	II	A
10	28.07.1997	Yanık yarası	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	I	A
11	04.08.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	A
12	14.08.1997	İdrar	Genel cerrahi	III	A
13	23.08.1997	Cerrahi yara	Genel cerrahi	II	A
14	03.09.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	C
15	14.09.1997	Balgam	Genel cerrahi	II	A
16	21.09.1997	Kateter yeri	Genel cerrahi	III	A
17	07.10.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	IV	B
18	09.10.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	IV	B
19	28.10.1997	Cerrahi yara	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	I	A
20	01.11.1997	Kan	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	I	A
21	06.11.1997	Kan	Genel cerrahi	II	A
22	18.11.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	II	A
23	29.11.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	I	C
24	06.12.1997	Yanık yarası	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	I	A
25	21.12.1997	Cerrahi yara	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	V	C
26	23.12.1997	İdrar	Genel cerrahi	II	A
27	23.12.1997	Cerrahi yara	Ortopedi ve travmatoloji	VI	B
28	24.12.1997	Kan	Genel cerrahi	II	A
29	26.12.1997	Cerrahi yara	Genel cerrahi	VII	A
30	29.12.1997	Yanık yarası	Plastik ve rekonstrüktif cerrahi	I	A

TARTIŞMA

MRSA'lar tüm dünyada hastane infeksiyonlarının en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. MRSA nedenli hastane infeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanenin benzer klinikleri arasında değişiklikler gösterebilmekte, hastanelerde MRSA infeksiyonlarının yayılımının kontrol edilebilmesi ise ancak bakterinin kay-

nağının ve hastaya geçiş yollarının kesin olarak saptanması ile mümkün olabilmektedir. Bu da şüphesiz epidemiyolojik tiplendirme yönteminin doğru seçilmesi ile başarılabilir bir husustur^[5,8,11,18]. Günümüzde epidemik stafilokok suşlarının ayırımına yönelik olarak fenotipik veya genotipik tiplendirme yöntemlerinin kullanıldığı bir çok araştırma yapılmıştır^[3,4,8,10,17,19]. Çalışmalarda yöntemler birbirleriyle karşılaştırılarak olumlu ve olumsuz yönleri tartışılmış,

ancak 12 yöntemin bir arada analiz edildiği araştırma da dahil olmak üzere ideal bir tiplendirme yöntemi tanımlanamamıştır^[3]. PPA, DNA temeline dayanan epidemiyolojik çalışmalarda ilk kullanılan yöntemlerden birisidir^[12]. Çok sayıda izolatin aynı zamanda çalışılabilmesi, kısa sürede testin tamamlanması, spesifik antijen veya protein gerektirmemesi, kolay uygulanabilme ve tekrarlanabilme gibi özellikleri nedeniyle MRSA'ların araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır^[10,11,20,21]. Ekstrakromozomal elementler olan plazmidlerin spontan olarak kaybolması veya konakçı bir suş tarafından kazanılabilmesi nedeniyle bu tür analizlerde çeşitli problemlerle karşılaşılabilir^[12]. Diğer taraftan plazmid taşımayan MRSA'ların varlığı da bu yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır^[11,22]. Bununla birlikte bir çok çalışmada yöntemin spesifitesi yüksek bulunmuştur ve epidemiyolojik amaçlı çalışmalarda büyük katkıları nedeniyle önerilmektedir^[3,10,18].

Faj tiplendirmesi referans bir epidemiyolojik tiplendirme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ancak, biyolojik olarak aktif faj ve kontrol suşlarının sadece referans laboratuvarlarda bulunması, mevcut bakteriyofaj panellerinin bazı suşları tiplendirememesi, tecrübeli teknik eleman gerektirmesi pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımında güçlüklerle karşılaşmaktadır^[5,12]. Bazı araştırmacılar fenotipik tiplendirme yöntemlerinin MRSA epidemilerini değerlendirmekte yeterli olmadığını, "pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)" gibi ayırım gücü daha yüksek olan genotipik yöntemlerin tercih edilmesi gerektiğini savunmaktadırlar^[4,23]. Ancak PFGE yönteminin pahalı olması dışında çok sayıda izolatin çalışılmasının zaman alıcı olması nedeniyle laboratuvarlarda rutin olarak kullanımında güçlüklerle karşılaşmaktadır^[5].

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 30 MRSA izolatinın 5 (%16.6)'inde plazmid saptayamadık. Zuccerelli ve çalışma arkadaşları plazmid çalışma grubundaki MRSA'ların %4.2'sinde plazmid saptayamamışlardır^[9]. Plazmid saptayamadığımız MRSA'ların dört tanesi aynı klinikten alınan örneklerden izole edilmiş ve AP-PCR yöntemi ile I. grup içinde yer almıştır. Plazmid saptanamayan ve diğerlerinden farklı klinikteki bir örnekten bulunan izolat 25 AP-PCR yöntemi ile tek başına bir grupta (V) yer almıştır. İzolat 17 ve 18 her iki yöntemle de aynı ve diğerlerinden farklı grup içinde (PPA'da B grubu ve AP-PCR'da IV. grup) bulunmuştur. Bu izolatların aynı klinikten ve çok az bir zaman farkı ile alınmış örneklerden izole edilmesi iki yöntemin duyarlılığını ortaya koymakta-

dır. AP-PCR yöntemi ile I. gruptaki 9, II. gruptaki 10, III. gruptaki 2 ve VII. gruptaki 1 izolat PPA yönteminde A grubunda yer almaktadır. Bu durum ise AP-PCR yönteminin spesifitesini ve ayırt edici gücününün daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. AP-PCR yöntemi ile I. grupta yer alan izolatların sekizi ortopedi ve travmatoloji, beşi plastik ve rekonstrüktif cerrahi kliniklerinde, II. gruptaki izolatların ise sekizi genel cerrahi, ikisi ortopedi ve travmatoloji kliniklerinde yatmakta olan hastalardan izole edilmiştir. Bu verilere göre AP-PCR yönteminin sonuçları bize ortopedi ve travmatoloji ile genel cerrahi kliniklerinde iki farklı klonun mevcut olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada bakteriler PPA ve AP-PCR yöntemleri ile gruplandırılmaya çalışılırken bakterilerin izole edildiği klinikler açısından herhangi bir gruplama yapılmamıştır. Diğer bir ifade ile ortopedi ve travmatoloji kliniği veya genel cerrahi kliniği örneklerinin PPA ve AP-PCR yöntemleri ile gruplandırılmaları şeklinde değil; 30 MRSA izolatinın PPA ve AP-PCR yöntemleri ile gruplandırılmasına çalışılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ile klonlar tespit edilmiş ve daha sonra bu klonların ait olduğu klinikler saptanmıştır. Sonuç olarak, verilerimiz özellikle ortopedi ve travmatoloji ile genel cerrahi kliniklerinde AP-PCR yöntemi ile tespit ettiğimiz iki farklı klonun hakim olduğunu göstermiştir. AP-PCR yöntemi ile V., VI. ve VII. gruplarda tek başına yer alan 3 izolat ayrı kliniklerden izole edilmiştir ve PPA yöntemi ile de farklı gruplar (C, B, A) içinde yer almaktadır. Bu da bize üç ayrı kliniğimizde farklı klonların mevcut olduğunu göstermiştir.

Epidemiyolojik amaçlı çalışmalar için kullanılacak yöntemler seçilmeden önce laboratuvarın olanakları gözden geçirilmelidir. Bir çok hastane laboratuvarında uygulanabilecek yöntemlerden biri olan AP-PCR'in en önemli avantajları çok yönlülüğü ve teknik açıdan basitliğidir. Bu yöntem bir çok izolatin 48 saat gibi kısa bir sürede çalışılmasına olanak sağlamaktadır^[2,8].

Çalışma sonucunda; çalışmanın gerçekleştirildiği üç kliniğimizde iki MRSA kökeninin endemik hakim suşlar olduğu saptanmıştır. Yöntem açısından AP-PCR yönteminin PPA'ya göre üstün tarafları olmakla birlikte; her iki yöntemin de uygulama ve yorumlama kolaylığı, tekrarlanabilme, her moleküler biyoloji laboratuvarında bulunabilecek cihaz ve maddelerle çalışabilme ve kısa sürede sonuç alabilme yönünden benzer özelliklere sahip oldukları yargısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Musser JM, Kapur V. Clonal analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: Association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2058-63.
2. Fang FC, Mc Clelland M, Donald GG, et al. Value of molecular epidemiologic analysis in nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. *JAMA* 1993; 270:1323-8.
3. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:407-15.
4. Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Nicole M, Serruys E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2599-605.
5. Kumari PDN, Keer V, Hawkey PM, et al. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997;37:881-5.
6. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andreumont A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993;31:982-5.
7. Albay A, Yıldırım ŞT, Saraçlı MA, Kısa Ö, Güney Ç. Nosokomial MRSA suşlarının plazmid profillerinin araştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 1999;41:134-7.
8. Otkun M, Akata F, Kocagöz S, ve ark. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un kantitatif antibiyogram ve "Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR)" yöntemleriyle epidemiyolojik sürveysi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997;1:106-15.
9. Zuccarelli AJ, Roy I, Harding GP, Couperus JJ. Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1990;28:97-102.
10. Collins JK, Smith JS, Kelly MT. Comparison of phage typing, plasmid mapping, and antibiotic resistance patterns as epidemiological markers in nosocomial outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984;2:239-45.
11. Oboyashi Y, Fujita J, Ichiyama S, et al. Investigation of nosocomial infection caused by arbekacin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:53-9.
12. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: Applications of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153-64.
13. Farmer JJ. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Kloos WE, Bannerman TL (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed, Washington: American Society for Microbiology, 1999:264-82.
14. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:539-66.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests*. Ninth Informational Supplement. M100-S9, Vol. 19, No: 1, Villanova PA. NCCLS, 1999.
16. Ünal S, Hopkins J, Flokowitsch JE, Ernie WU CY, Preston DA, Skatrud PL. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1685-91.
17. Welsh J, McClelland M. Characterization of Pathogenic Microorganisms by Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed-PCR. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds). *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1993 Mayo Foundation Rochester, 595-62.
18. Wildemaue C, Godard C, Vanhoof R, Van Bossuyt E, Hannecart-Pokorni E. Changes in major populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium. *J Hosp Infect* 1996;34:197-203.
19. Bialkowska-Hobrzanska H, Jaskot D, Hammerberg O. Evaluation of restriction endonuclease fingerprint of chromosomal DNA and plasmid profile analysis for characterization of multiresistant coagulase-negative staphylococci in bacteremic neonates. *J Clin Microbiol* 1990; 28:269-75.
20. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: Examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Review Infect Dis* 1986;8:682-92.
21. Einstein BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis* 1990;161:595-602.
22. Hartstein AI, Morthland VH, Eng S, Archer GL, Schoenknecht FD, Rashad AL. Restriction enzyme analysis of plasmid *Staphylococcus aureus* blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 1989;27:1874-9.
23. Tricinski K, Hryniewicz W, Kluytmans J, et al. Simultaneous persistence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of a warsaw hospital. *J Hosp Infect* 1997;36:291-303.

Yazışma Adresi:

Dr. Özgül KISA

Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

06018, Etlik - ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 08.02.2000

Kabul Tarihi: 22.05.2000