

Klinik Örneklerden İzole Edilen Hastane Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının rep-PCR ile Genotiplendirilmesi

Genotyping of Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens by rep-PCR

İsmail GÜLER, Hüseyin KILIÇ, Mustafa Altay ATALAY, Duygu PERÇİN, Barış Derya ERÇAL

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 25.02.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.07.2011

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonları, diğer enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında, artmış maliyet, mortalite ve hastanede kalış süresinin uzunluğu ile ilişkilidir. Bu nedenle, hastaların, personelin ve çevrenin taranmasıyla bu patojenin yayılımının kontrol altına alınması enfeksiyon kontrol programlarının yüksek önceliğidir. Bu çalışmada, hastane kaynaklı MRSA suşlarının klonal yakınlıklarının, son yıllarda hızlı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan rep-PCR (repetitive-sequence-based polymerase chain reaction) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Eylül 2008-Ekim 2009 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinde yatmakta olan hastaların klinik örneklerinden izole edilerek saklanmış olan toplam 100 MRSA suşu alınmıştır. Suşların metisilin direnci, CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. MRSA suşları arasındaki genetik yakınlığın belirlenmesi için rep-PCR (Diversilab, bioMerieux, Fransa) yöntemi kullanılmış ve yöntem dört aşamada gerçekleştirilmiştir: (1) Manuel DNA ekstraksiyonu (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit; MoBio Laboratories, ABD); (2) Termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR (Diversilab DNA Fingerprinting Kit); (3) Biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan elektroforez (Diversilab DNA LabChip kit); (4) İnternet tabanlı Diversilab yazılım programı (version 2.1.66) ile analiz ve hızlı değerlendirme. Çalışmamızda rep-PCR analizi sonunda üç ana klon [A (4 alt tip), B (2 alt tip) ve C (2 alt tip)] ve sekiz farklı klon (D-K) olmak üzere toplam 11 klon tespit edilmiş; A klonunun baskın tip olduğu belirlenmiştir. Toplam 100 MRSA suşunun %78'inin A klonuna ait olduğu (63'ü A1; 9'u A2; 4'ü A3 ve 2'si A4 alt tipi) izlenmiş; B klonuna ait 11 suş (10'u B1, 1'i B2), C klonuna ait üç suş (2'si C1, 1'i C2) ve diğer klonlara (D, E, F, G, H, I, J, K) ait ise birer suş saptanmıştır. A klonu, dahiliye yoğun bakım ünitesi (YBÜ) örneklerinin %93.3 (14/15)'ünden; enfeksiyon hastalıkları servisinde gönderilen örneklerin

İletişim (Correspondence): Dr. Mustafa Altay Atalay, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 4374937-20204, **E-posta (E-mail):** altayatalay@gmail.com

%66.6 (10/15)'sından ve hematoloji-onkoloji servisinde toplanan örneklerin %91 (10/11)'inden izole edilmiş; anestezi ve yenidoğan YBÜ'den izole edilen MRSA suşlarının tamamının da A klonuna ait olduğu görülmüştür. Bu suşların izolasyon tarihlerinin de birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, çalışma sürecinde hastanemizde A klonunun hakim olduğu ve MRSA suşlarının klonal yayılım gösterdiği ortaya konmuş ve rep-PCR yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek kolay uygulanabilir, hızlı ve başarılı bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; metisilin direnci; klonal ilişki; rep-PCR; genotiplendirme.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections are associated with increased cost, mortality and length of hospital stay compared with the other infections. Therefore, controlling the spread of this pathogen by screening patients, personnel and the environment remains as a high priority in infection control programs. The aim of this study was to detect the clonal relationship between nosocomial MRSA strains by using repetitive-sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) method which has several advantages owing to its speed and ease of use. A total of 100 MRSA stock strains that had been isolated from various clinical samples of hospitalized patients in Erciyes University Medical Faculty Hospitals between September 2008-October 2009, were included in the study. Methicillin resistance of the strains were determined by cefoxitin disc diffusion test according to CLSI guidelines. Rep-PCR (Diversilab, bioMerieux, France) method was performed in the following four steps in order to determine genetic proximity of MRSA strains: (1) Manual DNA extraction (UltraClean Microbial DNA Isolation Kit; MoBio Laboratories, USA), (2) Rep-PCR by using fingerprinting kits in the thermocycler (Diversilab DNA Fingerprinting Kit), (3) Automated microfluidic electrophoresis by bioanalyzer (Diversilab DNA LabChip kit), (4) Analysis and rapid evaluation with the use of web-based DiversiLab software (version 2.1.66). Rep-PCR analysis have shown the presence of a total 11 clones, including 3 major clones [A (4 subtypes), B (2 subtypes) and C (2 subtypes)] and 8 unique clones (D-K). Clone A was found to be the dominant type. Seventy-eight percent of the 100 MRSA isolates belonged to clone A (63 were A1; 9 were A2; 4 were A3, 2 were A4), 11% belonged to clone B (10 were B1, 1 was B2), 3% belonged to clone C (2 were C1, 1 was C2), and one of each belonged to the other clones (D, E, F, G, H, I, J, K). Clone A was isolated from 93.3% (14/15) of the samples sent from internal diseases intensive care unit (ICU), from 66.6% (10/15) of the samples sent from infectious diseases ward and 91% (10/11) of hematology-oncology ward samples. All MRSA strains isolated from anesthesiology and newborn ICU were of clone A. The isolation dates of these strains were in proximity. In conclusion, MRSA strains showed clonal dissemination in our hospital, clone A being the predominant one during the study period. Rep-PCR which is a rapid and reliable method, can easily be applied for molecular epidemiological purposes and aid to infection control measures.

Key words: *Staphylococcus aureus*; methicillin resistance; clonal relationship; rep-PCR; genotyping.

GİRİŞ

Metisilin bulunmasından çok kısa bir süre sonra metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları ortaya çıkmış ve tüm dünyada sağlık kuruluşlarında ve toplumda giderek artan bir problem haline gelmiştir¹. Hastane enfeksiyonu etkeni olan MRSA suşları, enfekte hastalar ya da bu suşlarla kolonize olan hastane personeli aracılığıyla kolaylıkla yayılarak tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle klinik örneklerde MRSA suşlarının saptanması ve bu suşların genotiplendirilmesi, hem klinik hem de ekonomik açıdan önem taşımaktadır². Enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldır-

maya yönelik epidemiyolojik çalışmalar, MRSA yayılımını önlemede ilk basamağı oluşturmaktadır³. Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler, MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesinde, MRSA izolatları arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamıştır⁴. MRSA izolatları arasındaki klonal ilişkinin tespiti, hem hastane enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkmasını sağlayacak hem de hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi açısından son derece faydalı olacaktır.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilip, stoklanmış olan MRSA türlerinin, son yıllarda hızlı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan rep-PCR (repetitive-sequence-based polymerase chain reaction) yöntemiyle genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Eylül 2008-Ekim 2009 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilerek -70°C'de saklanan 100 MRSA suşu dahil edildi. Her hastanın sadece bir klinik örneğine ait izolat değerlendirmeye alındı. Stok suşlar, kanlı agara ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi ve saf olarak üretilen suşların trehaloz-mannitol, tüp koagülaz ve DNase testleriyle *S.aureus* olduğu doğrulandı.

Metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi kullanıldı⁵. Bu amaçla önce, *S.aureus* taze kültürlerinden steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standardına göre süspansiyon hazırlandı ve steril eküvyon ile Mueller Hinton (MH) besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayıldı. MH besiyerleri oda ısısında 5-10 dakika bekletildikten sonra, besiyerinin yüzeyine sefoksitin (30 µg; Oxoid, İngiltere) diski yerleştirildi ve 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları değerlendirildi. CLSI kriterlerine göre ≤ 21 mm inhibisyon zonu metisiline dirençli, ≥ 22 mm inhibisyon zonu ise metisiline duyarlı olarak kabul edildi⁵.

MRSA suşları arasındaki genetik yakınlığın belirlenmesi için rep-PCR (Diversilab, BioMerieux, Fransa) yöntemi kullanıldı. Kanlı agara iki kez pasajları yapılarak elde edilen saf MRSA suşları, dört aşamada (manuel DNA ekstraksiyonu; termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR; biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan elektroforez; internet tabanlı yorumlama yazılım programı ile hızlı değerlendirme) genotiplendirildi. Kısaca; tüm suşlardan DNA izolasyonu "UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen DNA ekstraktlarının yeterli olup olmadığı jel elektroforezi uygulanarak kontrol edildi. Uygun şekilde elde edilen tüm DNA ekstraktlarına "Diversilab™ DNA Fingerprinting Kit" (BioMerieux, Fransa) kullanılarak rep-PCR uygulandı. Bu şekilde örneklerdeki nükleik asitler çoğaltıldıktan sonra "Diversilab™ DNA LabChip Kit"i (BioMerieux, Fransa) kullanılarak mikroakışkan elektroforez yapıldı. Tüm MRSA suşlarının rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları, internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, BioMerieux, Fransa) ile elde edildi. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında, Di-

versilab yazılımı Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pairwise Grouping Mathematical Avenaging; matematiksel ortalama ile ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi, rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı.

Verilerin analizinde, her bir izolat için jel benzeri görüntü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu. İzolatlar; ayırt edilemez (benzerlik > %97), benzer (benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı) ve farklı (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar ana klon; ana klonlar içerisinde de %97'nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar ise farklı klon olarak değerlendirildi.

BULGULAR

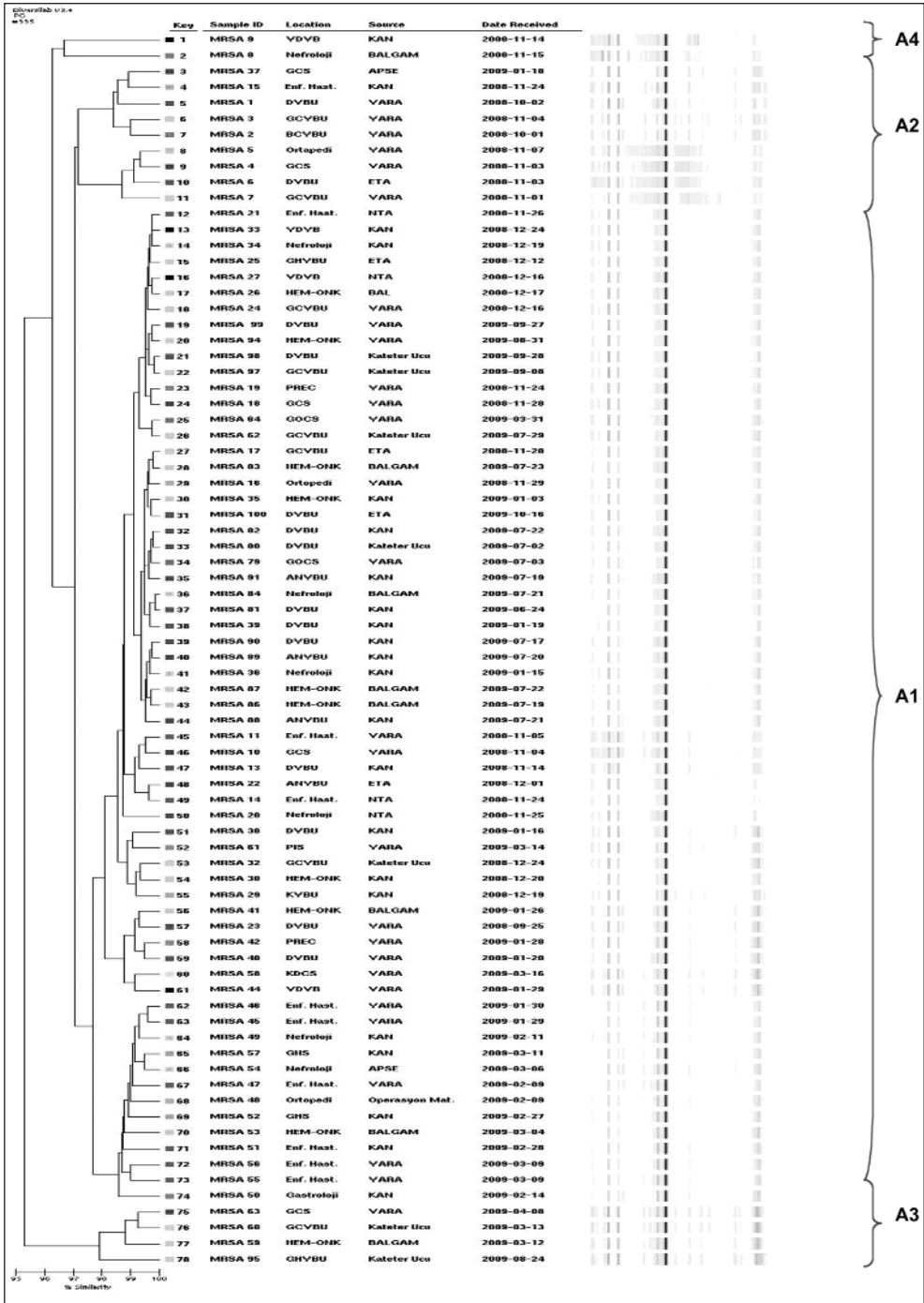
Çalışmaya alınan 100 MRSA suşunun 41'i yara, 26'sı kan, sekizi balgam, sekizi kateter ucu, altısı endotrakeal aspirat, dördü nazotrakeal aspirat, üçü apse, ikisi bronkoalveoler lavaj (BAL) ve birer adedi operasyon materyali ve plevral mayi örneklerinden izole edilmiştir. Örneklerin %40'ının yoğun bakım üniteleri (YBÜ) (Dahiliye: 15, Genel Cerrahi: 11, Anestezi: 4, Yenidoğan: 4, Kardiyoloji: 3, Göğüs Hastalıkları: 2, Beyin Cerrahi: 1); %18'inin cerrahi servisler (Genel Cerrahi: 8, Göğüs Cerrahi: 4, Ortopedi: 3, Plastik Cerrahi: 2, Kalp Damar Cerrahi: 1), %15'inin Erişkin Enfeksiyon Hastalıkları Servisi, %11'inin Hematoloji-Onkoloji Servisi ve %16'sının diğer servislerden (Nefroloji: 8, Göğüs Hastalıkları: 4, Gastroenteroloji: 2, Pediatrik İntaniye: 2) gönderildiği izlenmiştir. MRSA suşlarının %94'ü erişkin, %6'sı pediatrik hasta örneklerinden izole edilmiştir.

Diversilab rep-PCR ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmamızda üçü (A-C) ana klon olmak üzere toplam 11 klon (A-K) belirlenmiştir. MRSA suşlarının %78'inin A ana klonuna ait olduğu görülmüş ve A klonunun dört farklı alt tipi (A1-A4) saptanmıştır. A klonuna ait 78 izolatin 63 (%80.8)'ü A1; 9 (%11.5)'ü A2; 4 (%5.1)'ü A3 ve 2 (%2.6)'si A4 alt tipine aittir (Şekil 1). A klonuna ait örneklerin %43.6'sının YBÜ'den gönderilmiş olduğu izlenmiştir. A klonuna ait 78 suşun 60 (%76.9)'ı aynı duyarlılık paternini göstermiştir. Çalışmamızda ikinci hakim klon olarak B ana klonu (11 suş) belirlenmiş; bunun içerisinde de iki alt tip (B1-B2) saptanmıştır. B1 alt tipine ait 10 suş, B2 alt tipine ait bir suş tanımlanmıştır (Şekil 2). Çalışmada üçüncü ana klon olarak C ana klonu (üç suş) belirlenmiş ve bunun da iki alt tipi (C1, C2) saptanmıştır (Şekil 3). Çalışmada üç ana (A-C) klonun dışında, benzerlik oranları %95'ten küçük ve aralarında iki banttan daha fazla fark olan sekiz klon (D-K) daha belirlenmiştir (Şekil 4). Bu suşların yarısının (4/8) enfeksiyon hastalıkları servisinde gönderilen örneklerden izole edildiği izlenmiştir.

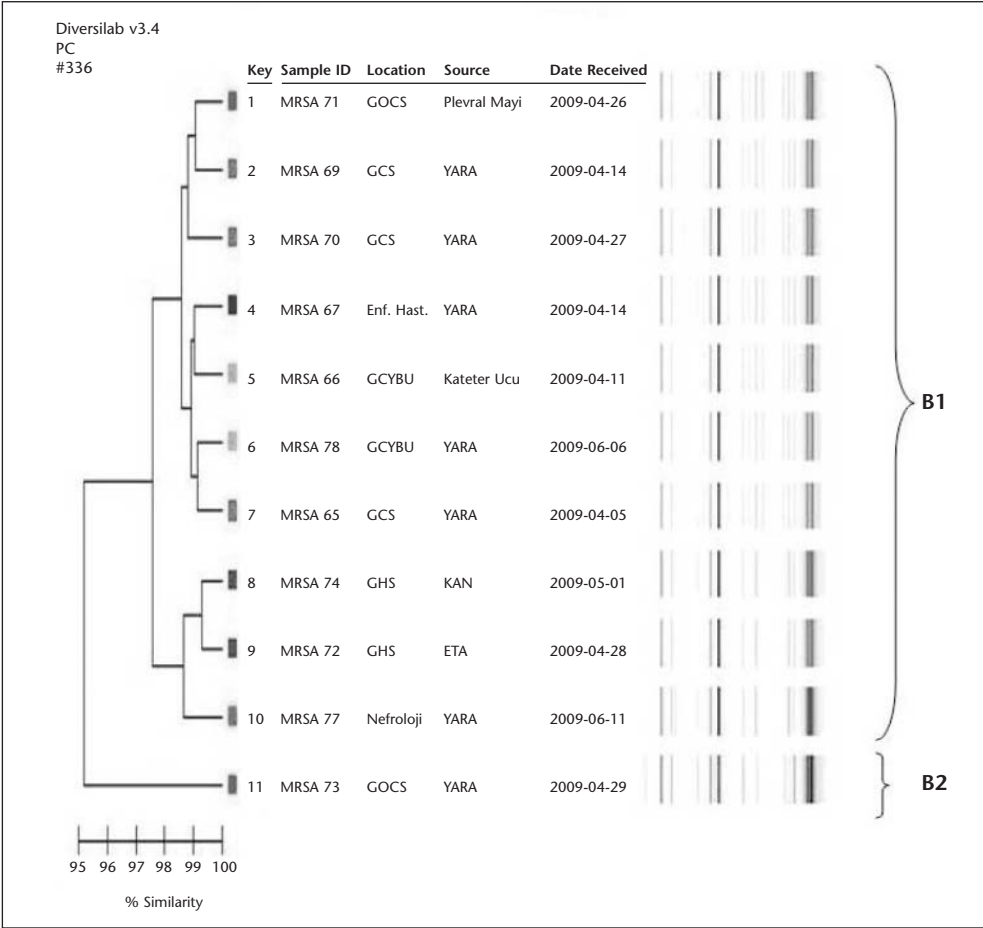
Tüm MRSA suşlarına ait Diversilab v3.4 yazılımı ile otomatik oluşturulan yüzde benzerlik matrisleri Şekil 5'te verilmiştir.

TARTIŞMA

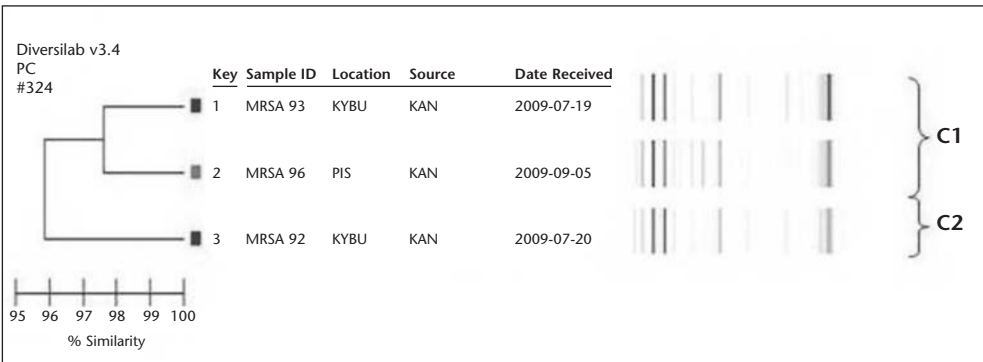
Hastane enfeksiyonuna yol açan mikroorganizmaların kaynağı ve bulaş yollarının belirlenmesi ve kontrol önlemlerinin alınmasında temel noktayı epidemiyolojik çalışmalar oluşturur⁶. Türlerin hızlı ayrımı, bir salgının olup olmadığına karar vermede, hastane enfeksiyonları kontrol araştırmaları için önemli bilgiler sağlar⁷. Antibiyotik duyarlılık testle-



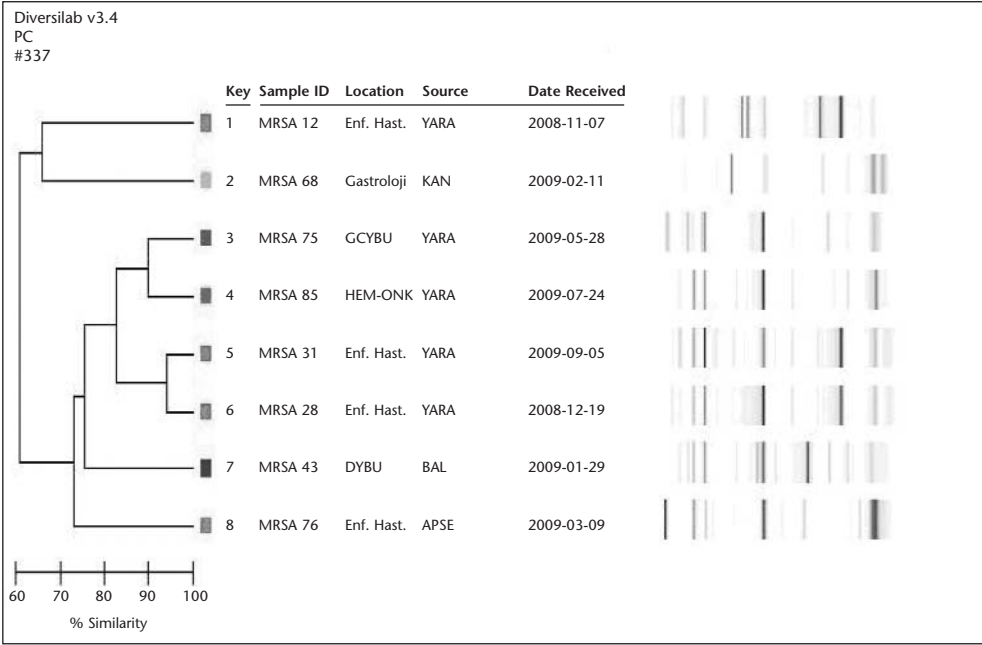
Şekil 1. A klonuna ait dendrogram.



Şekil 2. B klonuna ait dendrogram.



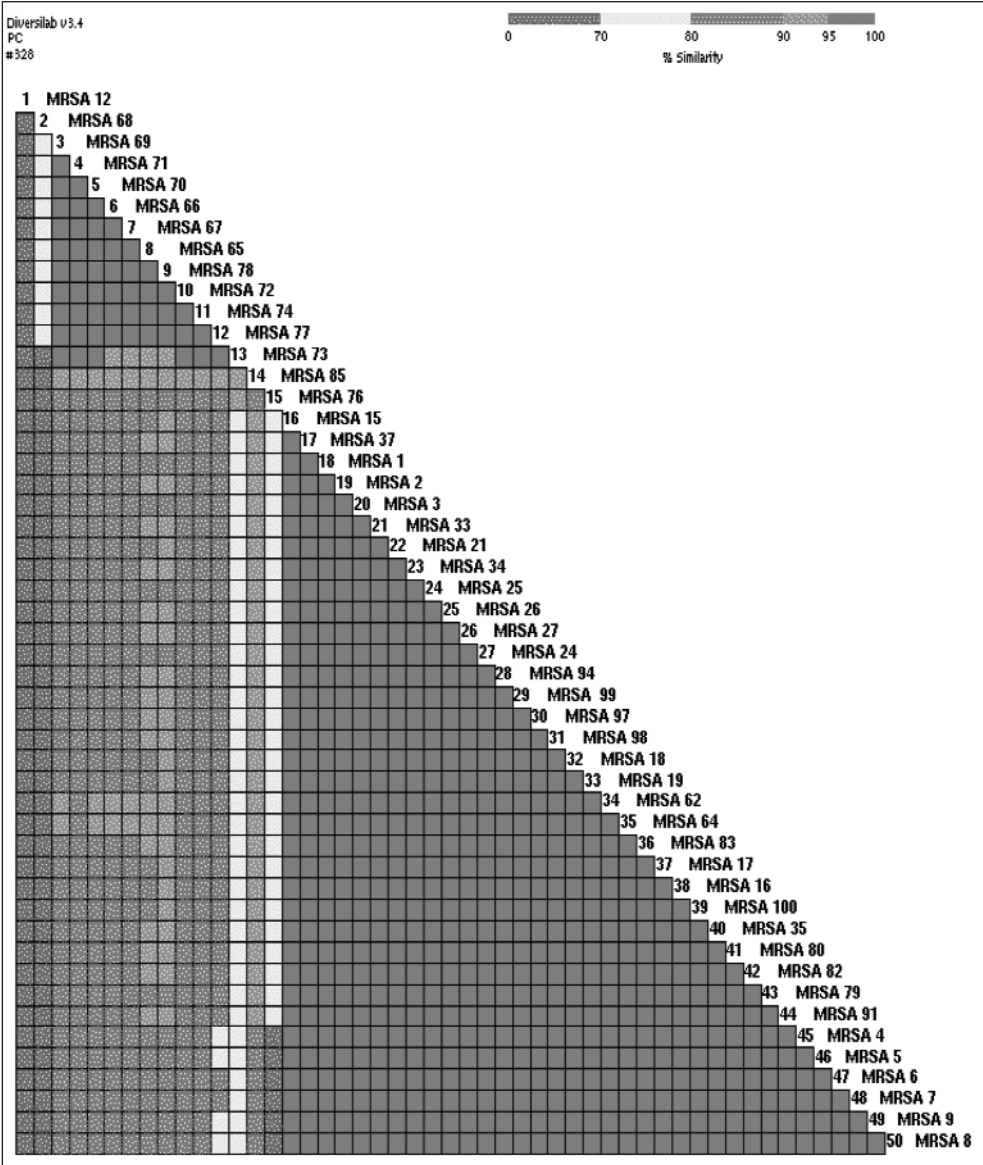
Şekil 3. C klonuna ait dendrogram.



Şekil 4. D, E, F, G, H, I, J, K klonlarına ait dendrogram.

ri, yaygın kullanımları, standardize edilmiş olmaları ve çok sayıdaki etkene uygulanabilirlikleri nedeniyle, birçok hastane salgınında temel tiplendirme aracı haline gelmiştir⁸. Ancak diğer fenotipik yöntemlerde olduğu gibi antibiyotik duyarlılık profilleri de, üreme ortamından, üreme fazından ve spontan mutasyon oranlarından etkilenebildiğinden kararlı bir tiplendirme yöntemi değildir. Bu sebeple tüm dünyada genotipik tiplendirme yöntemleri tercih edilmektedir⁹.

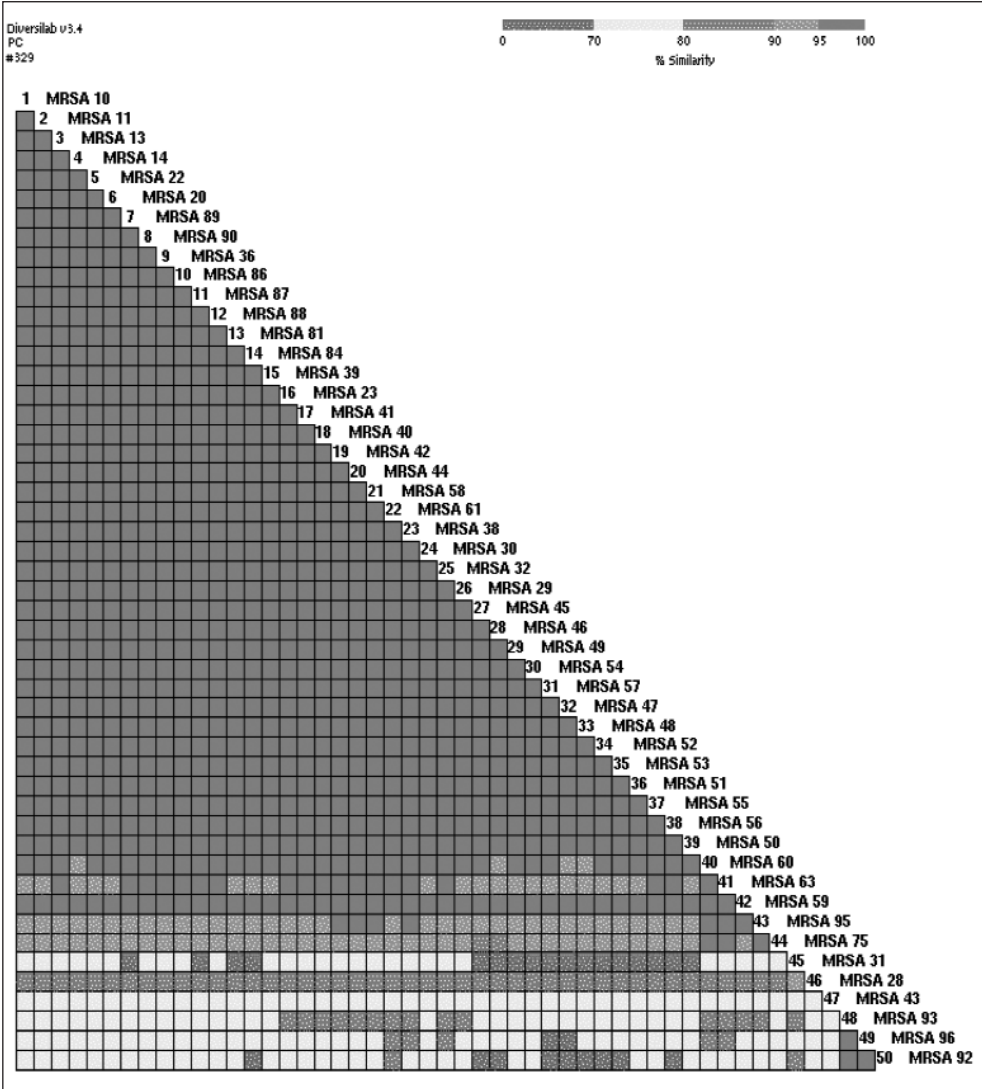
Genotiplendirme yöntemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan PFGE (pulsed field gel electrophoresis)'dir. Ancak, gerekli ekipmanın pahalı olması, yoğun emek gerektirmesi ve sonuçların elde edilme zamanının uzunluğu gibi dezavantajları vardır. Yöntem sonunda elde edilen bantların çok sayıda oluşu yorumlama güçlüğü yaratmaktadır. Ayrıca, bantların yorumlanmasında laboratuvarlar arasında henüz bir standart protokolün oluşturulmuş olmaması bir diğer dezavantajdır. Moleküler altyapısı olan birçok laboratuvar zaten gerekli ekipmana, eğitilmiş personele ve reaktiflere sahip olduğundan PCR-temelli yöntemler cazip hale gelmiştir^{10,11}. Bu yöntemler PFGE'ye göre daha hızlı, uygulaması kolay ve daha ucuz yöntemlerdir¹². Ross ve arkadaşları¹¹ beş farklı hastanedeki salgınlarda izole edilen toplam 109 MRSA suşunun klonal yakınlıklarını rep-PCR ve PFGE yöntemleriyle araştırmışlar ve yöntemler arasındaki uyumun, hastanelere göre değişiklik göstermekle birlikte %73-100 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kullanılan rep-PCR sistemi, ticari olarak temin edilebilen, kit-tabanlı uyarılan, DNA amplikonlarının fraksiyonu ve saptanmasında mikroakışkan çiplerin kullanıldığı yarı-oto-



Şekil 5. MRSA suşlarının benzerlik matrisi.

matik formatlı bir sistemdir¹³. Ek olarak, Diversilab sistemi internet-tabanlı bilgisayar-des-tekli veri analizi ve kullanıcıya özgü veri depolama ve erişim sistemi sağlamaktadır¹⁴.

MRSA'nın etken olduğu epidemiyolojik çalışmalarda suşlar arasındaki klonal ilişkiyi saptamak oldukça önemlidir. Bu çalışmada rep-PCR yöntemi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fa-kültesi Hastanesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA suşları arasındaki klonal



Şekil 5. MRSA suşlarının benzerlik matrisi (devamı).

ilişkiyi ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır. Araştırmamızda, MRSA izolatlarının klonal yakınlıkları incelendiğinde, üçü ana klon olmak üzere 11 farklı klon belirlenmiş ve A ana klonunun hakim tip (%78) olduğu görülmüştür. A klonu, dahiliye YBÜ hastalarına ait örneklerin %93.3 (14/15)'ünden; enfeksiyon hastalıkları servisinde gönderilen örneklerin %66.6 (10/15)'ından ve hematoloji-onkoloji servisinde toplanan örneklerin %91 (10/11)'inden izole edilmiştir. Ayrıca, anestezi YBÜ ve yenidoğan YBÜ'den izole edilen MRSA suşlarının tamamının A klonuna ait olduğu görülmektedir. Bu örneklerin ait oldu-

ğu hastaların kayıtları incelendiğinde, suşların izolasyon tarihlerinin birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bu veriler rep-PCR analizi sonucu hakim klon olarak tespit edilen A tipini gösteren suşların klonal olarak ilişkili olduklarını açıkça ortaya koymaktadır. Akçi-men ve arkadaşlarının¹⁵ Adana’da yaptıkları çalışmada da, hastane enfeksiyonu etkeni olan 46 MRSA izolatının genomik ilişkisi PFGE ile araştırılmış ve 42 suşun aynı A kümesi içinde yer aldığı ve yakın ilişki gösterdiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda ikinci hakim klon olarak belirlenen B klonunun izole edildiği örneklerin laboratuvara geliş tarihleri incelendiğinde, özellikle Nisan 2009, Mayıs 2009 ve Haziran 2009 tarihlerinde klonal yayılım gösterdiği görülmektedir. Çalışmada dikkat çeken diğer bir nokta; D, E, F, G, H, I, J, K olarak tiplendirilen suşların rep-PCR sonucu verdikleri bant profillerinin diğer tüm suşlardan farklı olmasıdır. Bu örneklerin laboratuvara geliş tarihleri incelendiğinde, tamamıyla farklı zamanlarda gönderilmiş oldukları anlaşılmaktadır. Böylece çalışmada kullanılan rep-PCR yönteminin MRSA tiplendirilmesinde epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların yakınlığını ortaya koymada olduğu kadar ilişkisiz izolatların ayırımında da başarılı olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak; günümüzde çoklu antibiyotik direncinin getirdiği tedavi güçlüğü ve hastane kökenli salgınlara yol açan bir patojen olması nedeniyle MRSA önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Hastanenin herhangi bir servisinde MRSA ile enfekte olan hastaların sayısında artış belirlenmesi, o servisteki bir MRSA epidemisinin habercisi olabilir. MRSA’ya bağlı salgınlarda, bir bölümde değişik hastalardan aynı tip bakterinin üretilmesi, bulaşın aynı kaynaktan hastadan hastaya bulaştığını göstermektedir. Bu durumda hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmanın kökeninin araştırılması gerekir. Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin kesin olarak belirlenmesiyle de, enfeksiyon kaynağı, taşıyıcıları ve yayılma yolu ortaya konularak uygun korunma önlemleri alınabilir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak tiplendirme yöntemlerinin kolay uygulanabilir, hızlı, güvenilir ve ucuz olması arzu edilmektedir. Bu kriterler göz önüne alındığında, çalışmamızda kullanılan rep-PCR yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek başarılı bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Shorr AF. Epidemiology and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: review and analysis of the literature. *Pharmaco Economics* 2007; 25(9): 751-68.
2. Maquelin K, Cookson B, Tassios P, van Belkum A. Current trends in the epidemiological typing of clinically relevant microbes in Europe. *J Microbiol Methods* 2007; 69(1): 222-6.
3. Deplano A, Vanechoutte M, Verschraegen G, et al. Typing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J Clin Microbiology* 1997; 35(10): 2580-7.
4. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundman H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(11): 7687-97.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. 2008. CLSI Document M100-18. CLSI, Wayne, PA.
6. Mete A. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve PCR-RFLP ile tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, 2005. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

7. Church DL, Chow BL, Lloyd T, Gregson DB. Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(1): 30-7.
8. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2119-25.
9. Huang YC, Su LH, Wu TI, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 307-10.
10. Cherly KS, June IP, Sam RP, et al. Clinical evaluation of the diversilab microbial typing system using repetitive sequence based-PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43(3): 1187-92.
11. Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5642-7.
12. Van Belkum A, Struelens M, De Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(3): 547-60.
13. Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Shah K, Kontoyiannis DP. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(9): 4016-24.
14. Healy M, Huong J, Bittner T, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 199-207.
15. Akçimen B, Nagiyev T, Biçer AT, Yula E, Yaman A, Köksal F. Adana Çukurova Üniversitesi Hastanesinde hastane infeksiyonuna yol açan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının pulsed field jel elektroforezi yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30(5): 1581-6.