

Staphylococcus aureus* Suşlarındaki Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk Difüzyon Testi, Otomatize Sistem ve Kromojenik Besiyerinin Karşılaştırılması

Comparison of Cefoxitin Disk Diffusion Test, Automated System and Chromogenic Medium for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates

Berrin UZUN¹, Aslı Gamze KARATAŞ ŞENER², Serdar GÜNGÖR², İlhan AFŞAR², Özlem YÜKSEL ERGİN³, Mustafa DEMİRCİ⁴

¹ İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-Kan Merkezi, İzmir.

¹ İzmir Atatürk Education and Research Hospital, Medical Microbiology-Blood Center, İzmir, Turkey.

² İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

² İzmir Atatürk Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, İzmir, Turkey.

³ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

³ İzmir Bozyaka Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, İzmir, Turkey.

⁴ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ İzmir Katip Celebi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma, XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Aydın)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 31.07.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.09.2012

ÖZET

Stafilokoklarda metisilin direnci *mecA* geni tarafından kodlanmakta, ancak *mecA* geninin heterojen ekspresyonu nedeniyle, metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi her zaman mümkün olamamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *mecA* geninin saptanması altın standart yöntem olmakla birlikte, çoğu laboratuvar da moleküler yöntemlerin çalışılabileceği olanaklar bulunmadığından, metisiline dirençli suşları hızlı ve doğru olarak saptayabilecek, kolay uygulanabilir fenotipik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde, *mecA* gen analizi çift primerli jel tabanlı multipleks PCR (Seplex, Seegene Inc, Kore), sefoksitin disk difüzyon testi (30 µg, Oxoid, İngiltere), otomatize sistem (Phoenix 100, Becton Dickinson, ABD) ve kromojenik CHROMagar MRSA besiyerlerinin (CHROMagar Microbiology, Salubris, Türkiye) performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Berrin Uzun, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji-Kan Merkezi, 35360 İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 243 4343, **E-posta (E-mail):** berrinuzun@gmail.com

tır. Çalışmaya, hastanede yatan hastaların yara yeri örneklerinden izole edilen 98 *Staphylococcus aureus* suşu alınmıştır. PCR ile 60 izolatin *mecA* geni taşıdığı belirlenmiş; izolatların 59'unda sefoksitin disk difüzyon (SDD) testiyle, 61'inde otomatize sistemle ve 65'inde CHROMagar MRSA besiyeri ile metisilin direnci tanımlanmıştır. PCR ile *mecA* geni tespiti referans yöntem olarak alındığında, metisilin direncini saptamada kullanılan testlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değeri SDD testi için sırasıyla %98.3, %100, %100 ve %97.4; otomatize sistem için sırasıyla %100, %97.4, %98.4 ve %100; CHROMagar MRSA besiyeri için %96.7, %81.6, %89.2 ve %93.9 olarak bulunmuştur. En yüksek duyarlılık ve negatif prediktif değer otomatize sistemde, en yüksek özgüllük ve pozitif prediktif değer SDD testinde elde edilmiştir. Kromojenik besiyerinin duyarlılığı 48 saat sonunda SDD testine yakın bulunmasına rağmen, özgüllüğü her iki inkübasyon süresi sonunda diğer testlerden daha düşük bulunmuştur. Kromojenik besiyerinin pozitif ve negatif prediktif değerleri de diğer testlere göre daha düşüktür. Moleküler inceleme yapılamayan laboratuvarlarda, metisilin direncinin saptanmasında stafilokok suşlarının *mecA* genini daha iyi indüklediği bilinen sefoksitin disk difüzyon testi veya iş yükü yoğun olan laboratuvarlarda otomatize sistemle minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MLK) belirlenmesi güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir. Sonuç olarak, kromojenik besiyerlerinin iş yükünün yoğun ve personel sayısının yetersiz olduğu laboratuvar koşullarında, özellikle tarama amaçlı kullanılabilmesi; ancak özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, yalancı pozitiflik olasılığına karşı pozitif saptanan suşların disk difüzyon ya da mikrodilüsyon gibi diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; metisilin direnci; *mecA*; PCR; sefoksitin disk difüzyon; otomatize sistem; kromojenik agar.

ABSTRACT

The *mecA* gene is responsible for the development of methicillin resistance in staphylococci however accurate detection of methicillin resistance is not feasible evermore because of heterogenous expression of *mecA* gene. Although *mecA* gene determination by polymerase chain reaction (PCR) is considered as the gold standard method, molecular tests are not easily applied in all routine laboratories. Thus, for the rapid and accurate diagnosis of MRSA strains, easy and practical phenotypic tests are still required. This study was aimed to compare the performance of *mecA* gene analysis by gel bases multiplex PCR with dual primer (Seeplex, Seegene Inc, Korea), cefoxitin disc diffusion method (30 µg, Oxoid, UK), automated system (Phoenix 100, Becton Dickinson, USA) and chromogenic medium CHROMagar MRSA (CHROMagar Microbiology, Salubris, Turkey) for the detection of methicillin resistance in staphylococci. It was found that 60 of the 98 *Staphylococcus aureus* strains carried the *mecA* gene. Methicillin resistance was observed by cefoxitin disc diffusion test in 59 isolates, by automated system in 61 isolates, and by CHROMagar MRSA in 65 isolates. When *mecA* gene analysis was considered as the reference method, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the tests that were used for the detection of methicillin resistance were found as 98.3%, 100%, 100% and 97.4% for cefoxitin disc diffusion (CDD) method; 100%, 97.4%, 98.4% and 100% for automated system; 96.7%, 81.6%, 89.2% and 93.9% for chromogenic medium CHROMagar MRSA, respectively. The highest sensitivity and negative predictive values were obtained by the automated system, and the highest specificity and positive predictive values were obtained by the CDD test. Although the sensitivity of chromogenic medium was found to be similar with the CDD test at the end of 48 hours, the specificity of chromogenic medium was lower than the other tests at the end of each incubation period. Likewise, positive and negative predictive values of the chromogenic medium were determined low compared to other tests. In laboratories that cannot perform molecular analysis, the determination of methicillin resistance should be done by the CDD test which is known to be a better inducer of the *mecA* gene expression of staphylococci. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) with automated systems can be the second choice especially in laboratories with intensive work loads. As a result chromogenic media can be particularly used for screening in laboratories that have a heavy workload and insufficient personnel number. However, due to its low specificity and the possibility of false

positive results, it was recommended that positive strains should be confirmed by other methods such as disc diffusion or microdilution.

Key words: *Staphylococcus aureus*; methicillin resistance; *mecA*; PCR; cefoxitin disc diffusion; chromogenic media.

GİRİŞ

Günümüzde giderek artan bir öneme sahip olan stafilokoklardaki metisilin direnci, *mecA* geni tarafından kodlanan ve penisilin bağlayan protein 2a/2' (PBP2a/PBP2') olarak adlandırılan bir proteinin üretimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu modifiye olmuş proteinin beta-laktam grubu antibiyotiklere afinitesi düşük olduğu için, tüm beta-laktam ve beta-laktam türevi antibiyotiklere karşı dirence neden olmaktadır^{1,2}. Tanımlandığından bu yana, rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin saptanması sorun oluşturmaktadır^{2,3}.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *mecA* geni varlığının saptanması altın standart yöntem olmakla birlikte, çoğu laboratuvar da moleküler yöntemlerin çalışılabileceği olanaklar bulunmadığından, hızlı ve doğru olarak metisiline dirençli suşları saptayabilecek, kolay uygulanabilir fenotipik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır². Son yıllarda, gerek yapılan çalışmalarda^{2,5,6} gerekse CLSI⁴ tarafından, sefoksitin diskinin *mecA* aracılı oksasiline direncinin gösterilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Metisilin direncinin saptanmasında kullanılmak üzere çeşitli ticari kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Kromojenik besiyerleri hedef mikroorganizmanın enzimlerinin kromojenik substratlarını içeren, mikroorganizmanın bu substratı kullanması ile renkli koloniler oluşturmalarını sağlayan besiyerleridir. Yapılan çalışmalarda kromojenik besiyerlerinin konvansiyonel besiyerlerine göre etken patojenleri daha kısa sürede saptama ve karışık kültürlerden ayırmada daha etkili olduğu gösterilmiştir⁷. Kromojenik substrat içeren besiyerlerinin maliyeti daha fazla olmasına karşın, tanımlama için ek test gereksinimini azaltmakta, zamandan tasarruf sağlamaktadır. Bu faktörler nedeniyle kromojenik besiyerlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır⁷.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geni varlığının gösterilmesiyle sefoksitin disk difüzyon testi, otomatize sistem ve kromojenik besiyerlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ekim 2011-Şubat 2012 tarihleri arasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, yatan hastaların yara yeri örneklerinden izole edilen 98 *Staphylococcus aureus* suşu dahil edildi. Bakteri tanımlaması için koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi, mannitol testi, DNaz ve koagülaz testleri uygulandı. Metisilin direncini belirlemek için; sefoksitin disk difüzyon testi, otomatize sistem (Phoenix 100, Becton Dickinson, ABD), kromojenik CHROMagar MRSA (CHROMagar Microbiology, Salubris, Türkiye) besiyerinde üreme ve *mecA* geni tayini için de multipleks PCR kullanıldı. Sefoksitin disk difüzyon testi (30 µg, Oxoid, İngiltere), CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon

yöntemiyle çalışıldı⁴. Suşlarda metisilin direncinin saptanmasında altın standart olarak kabul edilen *mecA* geni varlığı çift primerli jel tabanlı multipleks PCR (Seeplex, Seegene Inc, Kore) yöntemiyle üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Tüm suşlar kromojenik CHROMagar MRSA besiyerine ekildi ve plaklar 35°C'de aerobik ortamda inkübe edildi. Sonuçlar yirmi dört ve kırk sekiz saat sonunda üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirildi. Yirmi dört saatte pembe-kırmızı koloni oluşturan suşlar metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) olarak tanımlandı. Yirmi dört saatte üreme olmayan plakların inkübasyonları kırk sekiz saate uzatıldı. Kırk sekiz saatin sonunda plaklarda renksiz koloni oluşması veya üreme olmaması metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) olarak değerlendirildi. Standart suş olarak MRSA için ATCC 43300 ve MSSA için ATCC 25923 suşları kullanıldı.

Çalışmada kullanılan yöntemlerin metisilin direncini saptamadaki duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) hesaplandı.

BULGULAR

Multipleks PCR yöntemiyle, çalışmaya alınan 98 *S.aureus* suşundan 60'ının *mecA* geni taşıdığı saptanmıştır. PCR ile *mecA* pozitif saptanan izolatların tümünde (n= 60) otomatize sistemle, 59'unda ise sefoksitin disk difüzyon testiyle metisilin direnci tanımlanırken; kromojenik besiyerinde 24 saatte 55 suş, 48 saatte ise 58 suş metisiline dirençli olarak tespit edilmiştir. PCR ile *mecA* geni negatif bulunan 38 suşun birinde otomatize sistemle, 11'inde (24 saatte dört suş, 48 saatte yedi suş) ise kromojenik besiyerinde metisilin direnci saptanmış; sefoksitin disk difüzyon testiyle yalancı pozitiflik izlenmemiştir (Tablo I).

PCR ile *mecA* geni tespiti altın standart olarak kabul edildiğinde, çalışmamızda kullanılan testlerin metisilin direncini saptamadaki duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri Tablo II'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek duyarlılık ve NPD otomatize sistem ile, en yüksek özgüllük ve PPD sefoksitin disk difüzyon testi ile elde edilmiştir. Kromojenik besiyerinin duyarlılığı 48 saat sonunda sefoksitin disk difüzyon testine yakın bulunmasına rağmen, özgüllüğü her iki inkübasyon süresi sonunda diğer testlerden daha düşük bulunmuştur. Aynı şekilde kromojenik besiyerinin pozitif ve negatif prediktif değerleri diğer testlere göre düşük saptanmıştır.

Tablo I. *S.aureus* Suşlarında *mecA* Geni Varlığına Göre Kullanılan Yöntemlerin Sonuçları

Yöntemler	PCR			
	<i>mecA</i> Pozitif (n= 60)		<i>mecA</i> Negatif (n= 38)	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
Sefoksitin disk difüzyon testi	59	1	0	38
Otomatize sistem	60	0	1	37
Kromojenik besiyeri 24 saat	55	5	4	34
Kromojenik besiyeri 48 saat	58	2	7	31

Tablo II. mecA Geni Varlığı Altın Standart Olarak Alındığında Yöntemlerin Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri (%)

Yöntemler	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Sefoksitin disk difüzyon testi	98.3	100	100	97.4
Otomatize sistem	100	97.4	98.4	100
Kromojenik besiyeri 24 saat	91.7	89.5	93.2	87.2
Kromojenik besiyeri 48 saat	96.7	81.6	89.2	93.9

PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer.

TARTIŞMA

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptidlerin aşırı kullanımına ve gereksiz izolasyon tedbirlerinin alınmasına yol açmaktadır⁸. *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin tanımlanması ve doğrulanması için birden fazla yöntem bulunmakla birlikte konvansiyonel yöntemlerle sonuç verme süresi 2-4 gün arasında değişmektedir⁷. Direncin belirlenmesinde altın standart, *mecA* geninin PCR ile gösterilmesidir; ancak özel laboratuvar ortamı gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımı uygun değildir⁸⁻¹⁰. *mecA* geninin saptanmasının her laboratuvarında uygulanamaması nedeniyle, kolay uygulanabilir diğer yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır^{2,3,6}. MRSA tespitinde kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırıldığı ülkemizdeki çalışmalarda, sefoksitin disk difüzyon (SDD) testinin duyarlılığı %98-100, özgüllüğü ise %99-100 oranları arasında saptanmıştır^{6,8}. Boubaker ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasında, MRSA tespitinde SDD testinin özgüllüğü %100, duyarlılığı %96.5 olarak bildirilmiştir. Özel ve arkadaşları² disk difüzyon yöntemiyle metisilin direncini araştırdıkları çalışmada, *S.aureus* için sefoksitin diskinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini sırasıyla %94.3, %100, %100 ve %96 olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde çalışmamızda da SDD testinin duyarlılığı %98.3 ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Metisilin direncinin belirlenmesinde otomatize sistemler de kullanılmaktadır. Roisin ve arkadaşları¹², SDD testinin duyarlılık ve özgüllüğünü tüm MRSA izolatlarında sırasıyla %98.7 ve %100, otomatize sistemin ise sırasıyla %97.5 ve %100 olarak rapor etmiştir. Başka bir çalışmada⁵ duyarlılık ve özgüllük sırasıyla otomatize yöntemde %94 ve %100, SDD testinde ise her ikisi de %100 olarak bulunmuştur. Biyokimyasal olarak atipik olan fakat PCR analizi ve antibiyotik duyarlılıkları açısından MRSA olarak adlandırılan suşlarla yapılan bir çalışmada ise, Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminin MRSA tanımlanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır¹³. Eş zamanlı olarak otomatize iki sistemin metisilin direncini saptamadaki performanslarının değerlendirildiği bir çalışmada, Phoenix otomatize sisteminin duyarlılığı %99.8 ve özgüllüğü %100 bulunmuş; Vitek (bioMerieux Vitek, Mo.) sistemiyle birlikte her iki otomatize sistemin de klinik örneklerden MRSA tanımlanmasında güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır¹⁴. Ülkemizde *mecA* pozitif ve negatif suşların incelendiği bir çalışmada, Vitek otomatize sisteminin MRSA

saptanmasında duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %80 ve %100 olarak bildirilmiştir¹⁵. Bizim çalışmamızda da, otomatize sistemin (Phoenix, BD, ABD) duyarlılığı %100, özgüllüğü %97.4 olarak saptanmıştır.

Günümüzde, MRSA suşlarının hızlı bir şekilde tanımlanması amacıyla geliştirilmiş çok sayıda ticari besiyeri ve tanımlama kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır¹⁰. Kromojenik besiyerleri *S.aureus*'un hem tanımlanmasında hem de metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan pratik, göreceli olarak hızlı, duyarlılık ve özgüllükleri kabul edilebilir yöntemlerdir. Bu besiyerleri MRSA tanımlamasını direkt olarak yapabildiğinden ek testlere olan ihtiyacı azaltmakta, zaman ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlamaktadır⁷. Lagace-Wiens ve arkadaşları³ MRSA taranmasında seçici kromojenik besiyerlerinin iş yükünü toplamda %63.7, her bir örnek için ise %12.6 oranında azalttığını belirlemişler ve MRSA pozitif örnekler için raporlama süresinin ortalama 1.33 gün, MRSA negatif örnekler için ise 1.97 gün olduğunu bildirmişlerdir¹⁰. Çeşitli kromojenik besiyerlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, CHROMagar MRSA besiyerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde MRSA izolatlarını belirleme duyarlılıkları sırasıyla %59 ve %99.3, özgüllükleri %72 ve %92.1 olarak saptanmıştır¹⁶. Van Hal ve arkadaşlarının¹⁷, sürüntü örneklerinden MRSA saptanmasında moleküler yöntemler ve seçici agarları karşılaştırdıkları çalışmalarında, CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri sırasıyla 24. saatte %63, %99, %98, %81; 48. saatte %71, %67, %56 ve %79 olarak bulunmuştur. Uzmanmış inkübasyon süresi, seçici agarlarda yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Diederer ve arkadaşları¹⁸ CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılığını %95.4, özgüllüğünü %100 olarak bildirirken; Malhotra-Kumar ve arkadaşları¹⁹ bu besiyerinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini sırasıyla %81.9, %99.1, %83 ve %93 olarak saptamışlardır. Cesur ve arkadaşları¹⁰ CHROMagar MRSA besiyeri için duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini 48 saat sonunda sırasıyla %95.5, %37.6, %35.7 ve %96.1 olarak belirlemişlerdir. PCR ile *mecA* geni tespitinin referans yöntem olarak alındığı bazı çalışmalarda da, CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğü %82.9-87.7 ve %99.1-100 oranları arasında saptanmıştır²⁰⁻²². Ayrıca, son yıllarda tanımlanan yeni bir *mec* gen kompleksinin *mecA* geni ile %60-70 benzerlik göstermesi ve *mecA* PCR yöntemi ile saptanamaması nedeniyle, bu yeni homolog genin saptanması için ek tanı yöntemlerine gereksinim duyulacağı bildirilmektedir²³.

Stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi, özellikle heterojen metisilin direnci varlığı ve bu direncin de çevresel faktörlerden etkilenmesi nedeniyle, direncin saptanmasında CLSI'nın önerilerine önemle uyulmasını gerektirmektedir. Moleküler inceleme yapılamayan laboratuvarlarda metisilin direncinin saptanmasında, stafilokok suşlarının *mecA* genini daha iyi indüklediği bilinen SDD testi veya daha yoğun çalışılan yerlerde otomatize sistemle minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi güvenilir bir yöntem olarak kullanılmalıdır. Sonuç olarak, kromojenik besiyerlerinin iş yükünün yoğun ve personel sayısının yetersiz olduğu laboratuvar koşullarında özellikle tarama amaçlı kullanılabileceği; ancak özgüllüğünün düşük olması nedeniyle, yalnızca pozitiflik olasılığına karşı pozitif saptanan suşların diğer yöntemlerle (disk difüzyon, mikrodilüsyon) doğrulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. Clin Microbiol Infect 2006; 12(10): 1039-42.
2. Ozel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Cagatay M, Sencan I, Mert A. Comparison of oxacillin, cefoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disk diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 258-65.
3. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; 13(4): 408-12.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21st Informational Supplement M100-S21, 2011. CLSI, Wayne, PA.
5. Felten A, Grandry B, Langrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2766-71.
6. Coban AY, Darka O, Tasdelen Fisgin N, et al. Short communication: use of cefoxitin disc diffusion method for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul 2007; 41(1): 109-13.
7. Özen NS, Dağlar D, Özhaç Baysan B, et al. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. ANKEM 2011; 25(1):31-4.
8. Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması. Enfeksiyon Derg 2006; 20(2): 93-6.
9. Kuzucu C, Dalgalar M, Durmaz R, Dikerel S. Comparison of methods used to detect methicillin resistance in staphylococci. Mikrobiyol Bul 2002; 36(3-4): 253-7.
10. Cesur S, Yıldız E, İrmak H, et al. Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 279-284.
11. Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Abbas R, Ben Abdallah H, et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2004; 10(8): 762-5.
12. Roisin S, Nonhoff C, Denis O, Struelens M. Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2525-8.
13. Ishii Y, Alba J, Maehara C, et al. Identification of biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. J Med Microbiol 2006; 55(4): 387-92.
14. Junkins AD, Lockhart SR, Heilmann KP, et al. BD Phoenix and Vitek 2 detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. J Clin Microbiol 2009; 47(9): 2879- 82.
15. Atay T, Gulay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. ANKEM 2004; 18(4): 205-8.
16. Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley AL, Nicholson A, Gould FK. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4519-23.
17. Van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and genotype MRSA direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2486-90.
18. Diederens B, van Duijn I, van Belkum A, Willemse P, van Keulen P, Kluytmans J. Performance of chromagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1925-7.
19. Malhotra-Kumar S, Abrahantes JC, Sabiiti W, et al. Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2010; 48(4): 1040-6.

20. Stoakes L, Reyes R, Daniel J, et al. Prospective comparison of a new chromogenic medium, MRSA Select, to CHROMagar MRSA and mannitol-salt medium supplemented with oxacillin or cefoxitin for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 637-9.
21. Paule SM, Mehta M, Hacek DM, et al. Chromogenic media vs real-time PCR for nasal surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* impact on detection of MRSA-positive persons. Am J Clin Pathol 2009; 131(4): 532-9.
22. Han Z, Lautenbach E, Fishman N, Nachamkin I. Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 1): 43-6.
23. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *me-cA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11(8): 595-603.