

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Tiplendirilmesinde Plazmid Profil Analizi, RAPD ve PFGE Yöntemlerinin Ayrım Gücü İndekslerinin İncelenmesi[¶]

EVALUATION OF INDICES OF DISCRIMINATORY POWER OF PLASMID PROFILE ANALYSIS, RAPD AND PFGE METHODS FOR TYPING OF METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES

Kenan ŞENER*, Mehmet Ali SARAÇLI**, Cengiz Han AÇIKEL***, Levent DOĞANCI****

* Uz.Dr., GATA Mikrobiyoloji Uzmanı, TSK Rehabilitasyon ve Bakım Merkezi Mikrobiyoloji Lab. Sorumlusu,

** Doç.Dr., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Öğr.Üy.,

*** Uz.Dr., GATA Halk Sağlığı AD, Epidemiyoloji Yan Dal Uz.Öğr.,

**** Prof.Dr., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Başkanı, ANKARA

Özet

Amaç: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının tiplendirilmesinde epidemiyolojik bir araç olan üç moleküler yöntemin ayrım gücü indeksinin incelenmesi.

Gereç ve Yöntemler: Genetik ve epidemiyolojik ilişkisi bilinmeyen 81 nozokomiyal MRSA izolatı "plazmid profil analizi (PPA)", "random amplification of polymorphic DNA (RAPD)" ve pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemleriyle analiz edildi. Yöntemlerin ayrım gücünün değerlendirilmesinde Simpson'un Farklılık İndeksi kullanıldı.

Bulgular: Sekiz izolatta plazmid DNA'sı bulunamadı ve bu izolatlar PPA ile tiplendirilemedi. RAPD ve PFGE ile izolatların tümü tiplendirildi. Üç yöntemin de tekrarlanabilirliği %100 olarak belirlendi. PPA, RAPD ve PFGE yöntemlerinin ayrım gücü sırasıyla %48,6, %61,1 ve %80,1 olarak bulundu. Ayrım gücü yönünden en iyi yöntem PFGE idi. PPA ve RAPD kombinasyonu ile elde edilen ayrım gücü ancak PFGE yönteminin ayrım gücü seviyesinde bulundu (%80,1). Ayrıca RAPD ve PFGE yöntemlerinin birlikte uygulanmasının daha da iyi bir ayrım gücü sağladığı izlendi (%92,1). En iyi ayrım gücü her üç yöntemin kombinasyonu ile elde edildi (%94,8).

Sonuç: Sonuç olarak, test edilen üç yöntem içinde PFGE yöntemi MRSA suşları için en etkin ayrım gücüne sahiptir. Bununla birlikte, PFGE yöntemi zaman alıcı, teknik olarak karmaşık ve özel ve pahalı gereçler gerektirir. PPA ve RAPD'nin ayırt ediciliklerinin PFGE'ye göre daha düşük olmalarına karşın bu yöntemler teknik olarak basit ve daha ucuzdur. PPA ve RAPD MRSA izolatlarının tiplendirilmesinde tarama testi olarak, PFGE ise doğrulama testi olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Ayrım gücü, Simpson'un Farklılık İndeksi, MRSA, Moleküler yöntemler

Summary

Objective: Evaluation of indices of discriminatory power of three molecular methods as an epidemiological tool for typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Material and Methods: Eighty one nosocomial MRSA isolates with unknown genetic and epidemiological relatedness were analyzed by plasmid profile analysis (PPA), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) methods. Simpson's Diversity Index was applied in assessment of discriminatory power of typing methods.

Results: Eight isolates lacked plasmid DNA and could not be typed by PPA. All of the isolates could be typed by RAPD and by PFGE. Reproducibility of all three methods were found to be 100%. Discriminatory powers of PPA, RAPD and PFGE were determined as 48,6%, 61,1%, 80,1%, respectively. PFGE was the best method due to its higher discriminatory power. In respect of combination, the discriminatory power of PPA and RAPD combination reach the level of PFGE (80,1%). However, the application of RAPD and PFGE methods together produced a quite well discriminatory power (92,1%). The best discriminatory power is obtained by using the combination of the three methods (94,8%).

Conclusions: Out of the three methods tested, PFGE allowed the most effective discrimination of MRSA strains. However, PFGE is time consuming and technically demanding, and requires use of specialized and expensive equipment. Although PPA and RAPD are less discriminant than PFGE, these methods are technically simple and cheaper. PPA and RAPD can be used for screening purposes while PFGE as confirmatory test in typing of MRSA isolates.

Key Words: Discriminatory power, Simpson's Diversity Index, MRSA, Molecular Methods

Bakteriyel enfeksiyona bağlı olduğu düşünülen bir salgının araştırılmasında, salgınla ilişkili suşları tanımlamak ve epidemik olanlarla endemik veya sporadik olan izolatların ayırımını yapmak için tiplendirme yöntemlerine gereksinim bulunmaktadır (1). Kullanılan pek çok tiplendirme yönteminden hangisinin daha iyi performansa sahip olduğunu değerlendirecek objektif kriterler bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda özel koşullar altında, seçilmiş bir grup izolat kullanılarak bir yöntemin diğerine göre daha iyi veya daha kötü olduğu ortaya konmaktadır. Ancak bir tiplendirme yöntemini değerlendirecek veya pozitif ve negatif sonuçlarını doğrulayacak "altın standart" bir tiplendirme yöntemi henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte *Staphylococcus aureus* için PFGE yönteminin "altın standart" olduğu yönünde pek çok çalışma mevcuttur. Bu nedenle "duyarlılık" ve "özgüllük" gibi üniversal özelliklerin bu amaçla kullanılması çok uygun değildir. Tiplendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde kullanılan kriterler tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik, ayırım gücü, uygulama ve yorum kolaylığıdır (1-4). Ancak bu kriterlerden sadece ayırım gücü matematiksel olarak yani objektif biçimde ifade edilebilmektedir. Hunter ve Gaston epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların tiplendirilmesinde kullanılan yöntemin ayırım gücünün değerlendirilmesinde Simpson'un Farklılık İndeksinin kullanılabileceği görüşünü ortaya atmışlardır (5).

Bu çalışmada, epidemiyolojik olarak ilişkisiz olduğu bilinen nozokomiyal metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının tiplendirilmesinde plazmid profil analizi (PPA), "random amplification of polymorphic DNA" (RAPD), "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE) yöntemlerinin ayırım gücü yönünden karşılaştırılması ve kombine kullanımlarında ayırım gücündeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

İzolatlar: Ekim 1999 ve Ekim 2000 tarihleri arasında GATA Eğitim Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde yatarak tedavi gören hastalardan soyutlanan 81 nozokomiyal MRSA suşu çalışmaya dahil edilmiştir.

Plazmid Profil Analizi: Plazmid DNA izolasyonu Obayashi ve arkadaşlarının tanımladıkları yöntemle göre yapılmıştır (6). İzolatlara ait plazmid DNA'ları %0.8'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Etidyum bromürle boyanan plazmid DNA'ları UV ışık altında görüntülenmiştir.

RAPD: Nükleik asit izolasyonu yine Obayashi ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle göre yapılmıştır (6). Nükleik asitlerin randomize olarak çoğaltılma işlemi (amplifikasyon) Tambic ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle göre (7) M13 forward (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3') primeri kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen çoğaltma ürünleri (amplikonlar) %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulmuştur ve etidyum bromürle boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir.

PFGE: Kromozomal DNA izolasyonu Goering ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (8). Elde edilen kromozomal DNA'ların restriksiyon kesim işlemi *SmaI* restriksiyon endonükleaz kullanılarak yapılmıştır. PFGE işlemi De Lencastre ve ark.'nın tanımladıkları şekilde gerçekleştirilmiştir (9). RE kesimi tamamlanan DNA'ların bulunduğu bloklar, 0,5X TBE tamponuyla hazırlanmış %1'lik "pulsed field certified" agaroz jeldeki kuyucuklara yerleştirilmiştir. Elektroforez işlemi, CHEF-DR II PFGE cihazıyla 0,5X TBE tamponu kullanılarak 14°C'de, 6 V/cm, 20 saat süreyle, başlangıç değişim zamanı 5,3 sn. ve bitiş değişim zamanı 34,9 sn. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (10). Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra etidyum bromür ile boyanan kromozomal DNA parçaları UV ışık altında görüntülenmiştir.

Ayırım Gücü: Ayırım gücü aşağıdaki formülle ifade edilen Simpson'un Farklılık İndeksine göre hesaplanmıştır (5).

$$D=1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^K ni(ni-1) \times 100$$

D: Ayırım gücü indeksi
N: Toplam izolat sayısı
K: Toplam grup sayısı
n: Grup içindeki izolat sayısı
i: Grup numarası

Bulgular

PPA. Plazmid profil analiziyle tiplendirmeye alınan toplam 81 MRSA izolatından sekizinde

(%9,8) plazmid saptanamamıştır. Buna göre plazmid profil analizinin tiplendirebilirliği %80,2 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulunmuştur. Plazmid izole edilen 73 MRSA izolatının ise yaklaşık 2 kb, 4 kb, 11 kb ve 20 kb büyüklüğündeki dört farklı plazmidin oluştuğu beş plazmid paternine ayrıldıkları görülmüştür. Plazmid paternleri P1, P2, P3, P4 ve P5 ile ifade edilmiştir (Tablo 1). Plazmid profil analizinin ayırım gücü ise Simpson'un Farklılık İndeksi'ne göre %48,6 olarak hesaplanmıştır.

RAPD. RAPD yöntemiyle 81 MRSA izolatının tamamı (%100) tiplendirilmiştir. Standardize edilmiş protokole göre tekrarlanabilirlik %100 olarak bulunmuştur. Oluşan bantların büyüklükleri yaklaşık olarak 0,3 ile 1,5 kb arasında ölçülmüştür. Buna göre izolatlar 17 ayrı tip olarak gruplanmış ve her bir grup romen rakamlarıyla ifade edilmiştir (Tablo 1). RAPD yönteminin ayırım gücü Simpson'un Farklılık İndeksi'ne göre %61,1 olarak hesaplanmıştır.

PFGE. PFGE yöntemiyle MRSA izolatlarının tamamı (%100) tiplendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik %100 olarak bulunmuştur. Büyüklükleri yaklaşık 32 ile 736 kb arasında değişen en az 10 en fazla 17 bant oluştuğu görülmüştür. Buna göre izolatlar 20 farklı pulsotipe ayrılmış ve rakamlarla ifade edilmiştir (Tablo 1). PFGE yönteminin ayırım gücü Simpson'un Farklılık İndeksi'ne göre %80,1 olarak hesaplanmıştır.

Yöntemlerin tek tek veya birlikte kullanılmaları durumunda hesaplanan ayırım gücü indeksleri (Tablo 2)'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek ayırım gücüne sahip yöntemin PFGE yöntemi olduğu, PPA ve RAPD yöntemlerinin birlikte kullanılmasının ancak PFGE yöntemi kadar ayırım gücü sağladığı dikkat çekmiştir. RAPD-PFGE kombinasyonunun mükemmel ayırım gücü sağladığı, en yüksek ayırım gücünün her üç yöntemin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilebileceği görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Tüm dünyada önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olan *S.aureus*'un tiplendirilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Özellikle moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere paralel ola-

rak çoğu mikrobiyoloji laboratuvarı MRSA tiplendirilmesinde plazmid veya kromozomal DNA'ya dayalı moleküler tiplendirme yöntemlerini kullanmaya başlamıştır. Ancak ideal bir genotiplendirme yöntemi henüz geliştirilememiştir. Bu nedenle, tiplendirmede birden fazla yöntemin kombine olarak kullanılması gerekmektedir (11-13). Kullanılacak yöntemlerin seçiminde laboratuvar koşulları, eğitimli personel varlığı, zaman gereksinimi ve maliyet göz önüne alınmalıdır. Bununla birlikte kullanılacak yöntemin seçiminde daha objektif kriterlere gereksinim vardır. Bu nedenle objektif bir fikir verme açısından yöntemlerin ayırım gücü indekslerini bir kriter olarak kullanmak uygun görülmektedir.

Nozokomiyal MRSA izolatlarının moleküler tiplendirilmesinde sıklıkla PPA, RAPD ve PFGE yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden PPA ilk kullanıma giren DNA'ya dayalı tiplendirme yöntemidir. Tiplendirilecek izolatla plazmid bulunmadığında tiplendirme yapılamaması, plazmidin kaybedilmesi veya kazanılmasına bağlı olarak ortaya çıkan tekrar edilebilirlik sorunu ve buna bağlı olarak ayırım gücünün düşük olması gibi dezavantajlarına rağmen teknik olarak basit ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir (11-12). Bu nedenle PPA özellikle kısa süre içerisinde, belirli bir zaman dilimi ve belirli bir bölgedeki salgınlarda tercih edilebilir bir tiplendirme yöntemidir. Tenover ve ark. PPA'nın ayırım gücünü inceledikleri ve salgınla ilişkili 29 MRSA izolatında gerçekleştirdikleri çalışmalarında yöntemin ayırım gücünü %79,3 olarak hesaplamışlardır (12). PPA, MRSA'ların tiplendirilmesinde kullanılan ilk DNA'ya dayalı moleküler yöntem olup bu yöntemin kullanıldığı çalışmalar daha çok 80'li yıllara ait çalışmalardır. Bu çalışmalarda PPA'nın ayırım gücü değerlendirilirken salgınla ilişkili izolatlardan kaçının doğru olarak saptandığı ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz kaç izolatın ayırt edildiği göz önüne alınmıştır. Sunulan bu çalışmaya dahil edilen izolat popülasyonunun epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlardan oluşması nedeniyle ayırım gücünün saptanmasında Simpson'un Farklılık İndeksi kullanılmıştır ve PPA yönteminin ayırım gücü %48,6 olarak bulunmuştur. Saptanan ayırım gücünün

Tablo 1. MRSA İzolatlarının Genotipleri

İzolot No	Klinik	PPA	RAPD	PFGE	İzolot No	Klinik	PPA	RAPD	PFGE
6	Fizik Tedavi	P2	I	1	21	Genel Cerrahi	P2	VII	13
9	Plastik Cerr.	P2	I	1	42	Genel Cerrahi	P2	VII	13
10	Plastik Cerr.	P2	I	1	59	Yanık Merkezi	P2	VIII	1
14	Acil Tıp	P2	I	1	65	Plastik Cerr.	P2	XII	5
15	Genel Cerrahi	P2	I	1	13	Acil Tıp	P2	XIII	5
16	Beyin Cerr.	P2	I	1	48	Yanık Merkezi	P2	XV	14
17	Ortopedi	P2	I	1	61	Beyin Cerr.	P2	XV	1
19	İntaniye	P2	I	1	2	Genel Dahiliye	P2	XVII	11
20	Ortopedi	P2	I	1	11	Yanık Merkezi	P1	I	1
26	Genel Cerrahi	P2	I	1	25	Yanık Merkezi	P1	I	1
27	Plastik Cerr.	P2	I	1	38	Cildiye	P1	I	1
51	Fizik Tedavi	P2	I	1	39	Plastik Cerr.	P1	I	1
54	Genel Cerr.	P2	I	1	52	Endokrinoloji	P1	I	4
56	Üroloji	P2	I	1	28	Beyin Cerr.	P1	I	16
58	Ortopedi	P2	I	1	43	Plastik Cerr.	P1	I	18
60	Ortopedi	P2	I	1	31	Plastik Cerr.	P1	I	19
76	Beyin Cerr.	P2	I	1	68	Genel Cerrahi	P1	III	4
8	Genel Cerrahi	P2	I	2	45	Yanık Merkezi	P1	III	16
35	Genel Cerrahi	P2	I	2	53	Endokrinoloji	P1	X	4
40	Genel Cerrahi	P2	I	2	7	Yanık Merkezi	P1	X	10
41	Üroloji	P2	I	2	81	Yanık Merkezi	P1	XI	10
55	Genel Cerrahi	P2	I	2	57	Ortopedi	P1	XIV	1
74	Fizik Tedavi	P2	I	3	66	Yanık Merkezi	P1	XIV	5
46	Göğüs Hast.	P2	I	4	3	Yanık Merkezi	P1	XV	8
30	Genel Cerrahi	P2	I	6	67	Genel Cerrahi	P1	XV	8
33	Genel Cerrahi	P2	I	6	72	Beyin Cerr.	P1	XVI	11
37	Ortopedi	P2	I	6	22	Hematoloji	P1	XVI	15
5	Ortopedi	P2	I	7	29	Üroloji	P3	I	1
36	Üroloji	P2	I	7	50	Üroloji	P3	I	1
62	Acil Tıp	P2	I	9	34	Üroloji	P4	I	1
47	Göğüs Hast.	P2	I	12	44	Genel Cerrahi	P4	III	1
49	Ortopedi	P2	I	12	4	Genel Cerrahi	P5	V	20
18	Ortopedi	P2	I	14	23	Ortopedi	PY	I	1
75	Üroloji	P2	I	15	24	Üroloji	PY	I	1
80	Fizik Tedavi	P2	I	17	32	Ortopedi	PY	I	1
78	Ortopedi	P2	II	1	77	Üroloji	PY	I	1
79	Acil Tıp	P2	II	1	63	Plastik Cerr.	PY	I	9
12	Ortopedi	P2	III	7	70	Plastik Cerr.	PY	VIII	3
1	Ortopedi	P2	IV	8	64	Yanık Merkezi	PY	IX	2
71	Genel Cerrahi	P2	VI	3	69	Tıbbi Onkoloji	PY	XII	5
73	Genel Cerrahi	P2	VI	3					

PPA: Plazmid Profil Analizi, RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA, PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

düşük olmasının, izolatların büyük bir bölümünün aynı plazmid paternini göstermesine bağlı olduğu düşünülmüştür.

PPA gibi RAPD yöntemi de uygulanması basit ve bakterilerin kültürü dahil iki iş günü içinde sonuç verecek kadar hızlı bir yöntemdir. RAPD ile yapılan genotiplendirme çalışmalarında tekrarlanabilirlik genellikle temel bir problem olarak görülse de standardize edilmiş bir protokol uygulandığında tekrarlanabilirliğin oldukça yüksek

olduğu da pek çok makalede bildirilmiştir (14-19). Bu nedenle kısa sürede izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymada RAPD uygun bir yöntem olarak görünmektedir. RAPD yönteminin ayırım gücü Simpson'un Farklılık İndeksi'ne göre değişik çalışmalarda %55 ile %94,9 arasında bulunmuştur (7,18,20,21). Bu çalışmada ayırım gücü aynı yöntemle %61,1 olarak hesaplanmıştır. Saptanan ayırım gücünün düşük olması, kullanılan primerle oluşan bant sayı-

Tablo 2. Yöntemlerin Tek Tek ve Kombine Ayrım Gücü

(n = 81)	Grup Sayısı	En Geniş Gruptaki İzolat Yüzdesi (%)	Ayrım Gücü İndeksi (%)
PPA	5	60,5	48,6
RAPD	17	63,0	61,1
PFGE	20	42,0	80,1
PPA+RAPD	26	43,2	80,1
PPA+PFGE	33	34,5	87,6
RAPD+PFGE	39	25,9	92,1
PPA+RAPD+PFGE	46	20,9	94,8

PPA: Plazmid Profil Analizi, RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA, PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

sının diğer çalışmalarda bildirilenden az olmasına ve izolatların yarısından fazlasının tek bir grupta toplanmasına bağlı olabilir.

Bu çalışmada kullanılan üçüncü yöntem olan PFGE, MRSA izolatlarının tiplendirmesinde yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek ayrım gücüne sahip bir yöntemdir ve bakteriyofaj tiplendirmesinin yerine altın standart olarak kabul edilmeye başlanmıştır (22). PFGE yönteminin ayrım gücünün ortaya konulmasında genellikle salgınla ilişkili izolatlar ile epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları ayırt edip edemediği kontrol edilerek değerlendirme yapılmaktadır. Bununla birlikte epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların tiplendirilmesinde ayrım gücünün değerlendirilmesi için Simpson'un Farklılık İndeksi'nin kullanılması önerilmektedir (5). Fakat bu indeksin kullanıldığı çalışmalar nispeten azdır ve bu çalışmalarda ayrım gücü %83 ile %96,6 arasında bulunmuştur (8,20-21,23). Bizim çalışmamızda da ayrım gücü Simpson'un Farklılık İndeksi'ne göre hesaplanmıştır ve %80,1 olarak literatürle uyumlu bulunmuştur.

RAPD yönteminin PFGE yöntemiyle oldukça uyumlu sonuçlar verdiği yönünde çalışmalar olsa da genel görüş, PFGE yönteminin ayrım gücü ve tekrarlanabilirlik yönünden en iyi yöntem olduğu, PPA ve RAPD yöntemlerinin tekrarlanabilirlikle ve dolayısıyla ayrım gücüyle ilgili sorunlar taşıdığı yönündedir (6-7,12,14,18,20,24-25). Buna karşın bu çalışmada PPA ve RAPD kombinasyonunun ayrım gücünün ancak PFGE düzeyine ulaştığı bulunmuştur. Diğer yandan RAPD ve PFGE yöntemlerinin birlikte kullanımı %92,1 gibi ol-

dukça iyi bir ayrım gücü sağlanmıştır. En yüksek ayrım gücü ise doğal olarak her üç yöntemin birlikte kullanılmasıyla elde edilmiştir. Referans yöntem olan PFGE'nin kurulum ve test maliyetinin yüksek olması ve uzun sürede sonuç vermesi en önemli dezavantajlarıdır. Bu nedenlerle, göreceli olarak daha ucuz ve hızlı olan PPA ve RAPD yöntemlerinin epidemiyolojik araştırmalarda öncelikle tarama amaçlı olarak kullanılması, ileri genotiplendirme ve doğrulama çalışmalarında ise PFGE yönteminin ilave olarak uygulanması daha uygun görülmektedir.

Sonuç olarak epidemiyolojik bir araştırmada her üç yöntemin birlikte kullanımının mükemmel bir ayrım gücü sağlayacak düzeyde olduğu görülmektedir. Ancak, hastanenin belirli bir yerinde lokalize bir salgın durumu varsa, izolatlar arasındaki ilişki hızlı ve ekonomik bir şekilde ortaya konmak isteniyorsa PPA ve RAPD kombinasyonu tercih edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC: ASM Press, 1999: 116-37.
2. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Rıza Durmaz, ed. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2nci Baskı. Malatya, 2001: 139-47.
3. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-9.
4. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. Infect Cont Hosp Epidemiol 1997; 18: 426-39.

5. Hunter PR and Gaston MA. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2465-6.
6. Obayashi Y, Fujita J, Ichiyama S, Hojo S, Negeyama K, Takashima C, Miyawaki H, Tanabe T, Yamaji Y, Kawanishi K, Takahara J. Investigation of nosocomial infection caused by arbekacin resistant, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28: 53-9.
7. Tambic A, Power EGM, Tambic T, Snur I, French GL. Epidemiological analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using randomly amplified polymorphic DNA typing method. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 335-40.
8. Goering RV and Duensing TD. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci. J Clin Microbiol 1990; 28: 426-9.
9. De Lancastre H, Couto I, Santos I, Melo-Cristino J, Pereira AT, Tomasz A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* disease in Portuguese hospital: characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 64-73.
10. van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover FC, Steward C, El Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Varkila JV, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. J Clin Microbiol 1998; 36: 1653-9.
11. Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis. In: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in Human Disease. New York: Churchill Livingstone, 1997. 253-83.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1994; 32: 407-15.
13. Weller TMA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? J Hosp Infect 2000; 44: 160-172.
14. Struelens MJ, Bax R, Deplano A, Quint W, van Belkum A. Concordant clonal delineation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting. J Clin Microbiol 1993; 31: 1964-70.
15. Van Belkum A and Meis J. Polymerase chain reaction mediated DNA fingerprinting in bacterial epidemiology. Clin Infect Dis 1994; 18: 1017-8.
16. Van Belkum A, Bax R, Peerbooms P, Goessens WHF, van Leeuwen N, Quint WGV. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1993; 31: 798-803.
17. Van Belkum A, Bax R, Prevost G. Comparison four genotyping assay a for epidemiological study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 420-4.
18. Van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E, Fluit A, Vandenbroucke-Grauls C, van den Brule A, Koeleman H, Melchers W, Meis J, Elaichouni A, Vanechoutte M, Moonens F, Maes N, Struelens M, Tenover FC, Verbrugh H. Multicentre evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1995; 33: 1537-47.
19. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by PCR. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 174-84.
20. Deplano A, Vanechoutte M, Verschraegen G, Struelens MJ. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of Inter-IS256 spacer length polymorphisms. J Clin Microbiol 1997; 35: 2580-7.
21. Van Leeuwen W, Verbrugh H, van der Velden J, van Leeuwen N, Heck M, Van Belkum A. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 664-7.
22. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 551-5.
23. Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2186-90.
24. Hojo S, Fujita J, Negayama K, Ohnishi T, Xu G, Yamaji Y, Okada H, Takahara J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Jpn Assoc Infect Dis 1995; 69: 506-10.
25. 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.

Geliş Tarihi: 22.07.2003

Yazışma Adresi: Dr. Kenan ŞENER
GATA Mikrobiyoloji Uzmanı, TSK
Rehabilitasyon ve Bakım Merkezi
Mikrobiyoloji Lab. Sorumlusu, ANKARA
ksener@rehab.gata.edu.tr

*Bu çalışma 30 Eylül-5 Ekim 2002 tarihleri arasında Antalya'da yapılan XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde "Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Tiplendirilmesinde Plazmid Profil Analizi, RAPD ve PFGE Yöntemlerinin Ayrım Gücü İndeksinin İncelenmesi" başlığıyla yazılı poster olarak (P11-04) sunulmuştur.