

Nozokomiyal Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* İzolatlarının Tiplendirilmesinde Hangi Yöntemi Kullanalım?

WHICH METHODS TO USE FOR TYPING OF NOSOCOMIAL METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES?

Kenan ŞENER*

* Uz.Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi TSK Rehabilitasyon ve Bakım Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA

Özet

Çoklu ilaç direnci olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a bağlı infeksiyonların tedavisi zor ve pahalı olduğundan çoğu infeksiyon kontrol programının ilk hedefi MRSA yayılımını kontrol altına almaktır. Suşların tiplendirilmesi, şüpheli bir salgının araştırılması veya hastane infeksiyonlarının yayılımının izlenmesinde önemli bir epidemiyolojik araç haline gelmiştir. Tiplendirme yöntemleri iki temel kategoriye ayrılır: fenotipik ve genotipik yöntemler. Plazmid profil analizi (PPA), "random amplification of polymorphic DNA (RAPD)" ve "pulsed field gel electrophoresis (PFGE)" en çok önerilen genotipik yöntemlerdir. Tiplendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde kullanılan spesifik kriterler tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırım gücüdür. İdeal bir tiplendirme yöntemi aynı zamanda hızlı, ucuz, teknik olarak basit ve kolay elde edilebilir olmalıdır. Bununla birlikte günümüzde MRSA'ların tiplendirmesinde kullanılan en iyi yöntemin hangisi olduğu konusunda ortak bir görüş yoktur.

Anahtar Kelimeler: MRSA, Plazmid profil analizi, Random amplification of polymorphic DNA, Pulsed field jel elektroforezi

T Klin Mikrobiyoloji-Enfeksiyon 2004, 3:15-28

Summary

Treatment of the infections due to multidrug resistant MRSA strains is difficult and costly. For this reason, controlling MRSA remains a primary focus of most hospital infection control programs. Typing of strains has become an important epidemiological tool to investigate suspected outbreaks and to evaluate nosocomial transmission. Typing methods fall into two major categories: phenotypic and genotypic methods. Plasmid profile analysis (PPA), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) are the most preferred genotypic methods. Typeability, reproducibility and discriminatory power are specific criteria for evaluating such methods. An ideal typing method also would be rapid, inexpensive, technically simple and readily available. However, at present there is no consensus regarding the best method to use for typing MRSA strains.

Key Words: MRSA, Plasmid profile analysis, Random amplification of polymorphic DNA, Pulsed field gel electrophoresis

T Klin J Microbiol-Infec 2004, 3:15-28

Staphylococcus aureus sadece gelişmekte olan ülkelerde değil, gelişmiş sağlık sistemlerine sahip ülkelerde bile etkin infeksiyon kontrol önlemlerine rağmen hastane kökenli (nozokomiyal) infeksiyonların etiyojisinde üçüncü sırada, postoperatif yara infeksiyon etkenleri arasında ise ilk sırada bildirilen bir patojendir (1). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları daha çok fırsatçı bir patojen gibi davranmaktadırlar. Bu nedenle çok sayıda hasta kolonize ya da infekte oluncaya kadar MRSA problemi gözden kaçabilmekte ve bu mikroorganizma kolaylıkla endemik hale gelebilmektedir. Birden fazla hastaneyi etkileyen

MRSA suşları İngiliz Hastane İnfeksiyon Topluluğu'na ait bir laboratuvar olan "Laboratory of Hospital Infection (LHI)"a göre epidemiyolojik MRSA (EMRSA) olarak adlandırılmaktadırlar (2).

Stafilokoklarda metisilin direnci yıllar içinde yavaş bir ilerleme göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde *S.aureus* suşlarında 1970'li yılların ortalarında %3-5 olan metisilin direnci 1975-1991 yılları arasında %11, 1990'lı yıllarda %18'e çıkmıştır. MRSA prevalansında en belirgin artış da büyük hastanelerde (>500 yatak) gözlenmiştir. Centers for Disease Control (CDC) tarafından koordine edilen "Ulusal Hastane İnfeksiyon

İzleme Çalışması” [National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)]’nda 1970’li yılların başından itibaren ABD’de tüm hastanelerden epidemiyolojik veriler toplanmış ve nozokomiyal infeksiyon etkenlerinin dağılımı araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre 1986-1989 yılları arasındaki dönemde en sık izole edilen nozokomiyal infeksiyon etkeni *E.coli*’dir. Bunu sırasıyla enterokoklar, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S.aureus* izlemektedir. *S.aureus* nozokomiyal yara infeksiyonlarında en sık izole edilen etkidir. Ayrıca nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemi etkenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. (2). Ülkemizdeki çeşitli hastanelere ait MRSA sıklığı ise 1988-1995 yılları arasında %9 ile 45 arasında bildirilmiştir (2). Genel olarak bakıldığında, MRSA sıklığının yüzdesi araştırmacılara göre farklılıklar gösterse de aynı hastanelere ait MRSA sıklığında yıllar içinde bir artış görülmektedir.

Hastane içinde ortaya çıkmış bir epideminin epidemiyolojik veriler ışığında kısa sürede tanımlanması veya önlenmesi nozokomiyal infeksiyonların sayısını ve doğal olarak maliyetini azaltır. Bu konuda yapılan bir çalışmaya göre rutin mikrobiyal köken tayini içeren bir infeksiyon kontrol programının uygulanmasıyla nozokomiyal infeksiyonlarda belirgin bir düşüş ve iki yılın üzerinde bir sürede 4 milyon dolardan fazla tasarruf sağlandığı gösterilmiştir (3). MRSA infeksiyonları, hem tedavinin hem de patojenin eradikasyonunun güç olması nedeniyle hasta mortalite ve morbiditesi yanında oldukça yüksek maliyetlere de neden olmaktadır. Bu nedenle, diğer tüm nozokomiyal infeksiyonlarda olduğu gibi MRSA infeksiyonlarının da infeksiyon takibi ve kontrol çalışmaları önemlidir. Bunun için kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmaya ihtiyaç vardır. Hastane epidemiyolojisiyle ilgili çalışmaların önemli basamaklarından birisi elde edilen izolatların klonal kökenli olup olmadığının belirlenmesidir. MRSA infeksiyonlarının epidemiyolojik incelemesinin yapılabilmesi için suşları birbirinden ayırt edebilecek ya da aralarındaki benzerliği kanıtlayabilecek yöntemler kullanılması gerektiği bilinmektedir. Ancak MRSA suşları arasındaki yakın genetik benzerlikler nedeniyle rutin bakteriyolojik yöntem-

lerle tiplendirme yapılabilmesi mümkün değildir. Henüz MRSA suşları için tüm gereksinimleri karşılayabilecek tek bir tiplendirme sistemi tanımlanmamıştır. Günümüzde nozokomiyal epidemilerin analizinde kullanılan tiplendirme yöntemleri MRSA suşları arasındaki fenotipik (antibiyotik duyarlılığı, bakteriyofaj tiplendirmesi, multilokus enzim elektroforezi, protein elektroforezi gibi) veya genotipik (plazmid profili, kromozomal DNA restriksiyon analizi, “random amplification of polymorphic DNA”-polimeraz zincir reaksiyonu, “pulsed field gel electrophoresis” gibi) farklılıkları esas almaktadır (4).

Bu makale MRSA ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak tiplendirme yöntemlerini kısaca gözden geçirmek ve bu konuda çalışmak isteyenlere yöntem seçiminde bir ön fikir vermek amacıyla derlenmiştir.

MRSA Tiplendirme Yöntemleri

MRSA suşları arasında ayırım yapmak için pek çok tiplendirme yöntemi tanımlanmıştır. O halde nozokomiyal MRSA’ların tiplendirilmesinde hangi yöntemin kullanılacağına nasıl karar vermeliyiz? Tiplendirme yönteminin etkinliği tiplendirebilme özelliğine, ayırım gücünün yüksekliğine, tekrar edilebilirliğine, kullanım ve yorum kolaylığına bağlıdır. İdeal bir tiplendirme yöntemi aynı zamanda hızlı sonuç verebilmeli, ucuz, teknik olarak basit ve yaygın olarak elde edilebilir bir sistem olmalıdır (4-7).

MRSA’ların tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler iki gruba ayrılmaktadırlar:

1. Geleneksel (fenotipik) yöntemler
2. Moleküler (genotipik) yöntemler (5-10)

1. Geleneksel (Fenotipik) Tiplendirme Yöntemleri

Geleneksel veya konvansiyonel yöntemler olarak da bilinen fenotipik yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymaktadırlar. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ortaya koyan biyotipik profillerine, antibiyotik duyarlılıklarına, duyarlı

oldukları faj tiplerine, protein içerikleri gibi birçok özelliklerine dayalı fenotipik yöntemler mevcuttur. Fenotipik farklılıkları ortaya koyan tiplendirme yöntemlerinin temel dezavantajı mikroorganizmaların fenotipik özelliklerini değiştirme eğilimleridir. Bu değişiklikler önceden tahmin edilemez veya değişen çevre koşullarına bir cevap olarak oluşabilirler. Buna ilaveten serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi pek çok fenotipik yöntem, çeşitli özgül reaktanlara gereksinim duyarlar. Ayrıca bir tek nükleotidde meydana gelen nokta mutasyonları herhangi bir fenotipten sorumlu genin fonksiyonunu veya regülasyonunu bozabilir. Böylece fenotipik olarak farklı, ancak buna karşılık genotipik olarak ayırtedilemez veya hemen hemen aynı olan izolatlar da ortaya çıkabilirler (5).

a) Biyotiplendirme

Biyotiplendirme ile bir izolatın biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojisi ve çevresel şartlara toleransı (bazı besiyerlerinde ve ekstrem pH ve sıcaklıklarda üreme v.b.) gibi özgül metabolik aktivite paterni ortaya konur. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırmada (taksonomi) ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. Güvenilir, otomatize veya modüler paneller ticari olarak bulunmaktadır. Ancak, *S.aureus* suşlarının ayırımında biyokimyasal reaksiyonların kullanımı yetersizdir (5,6). Ayrıca, MRSA suşlarının saptanmasında oldukça özgül ve duyarlı bir yöntem olan ve proteinA ve/veya hücre yüzeyindeki kümeleşme faktörünün saptanmasına yönelik lateks agglutinasyon yöntemi bile, bazı MRSA suşlarının reaksiyon vermemesi nedeniyle stabil değildir ve değişkenlik gösterebilir (5,11-12).

b) Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Yeni veya alışılmadık bir antibiyotik direnç paterninin tanımlanması sıklıkla bir salgının ilk göstergesi olabilir (7,13). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları çoğu bakteriyel izolatların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarını rutin olarak test etmektedirler. Konvansiyonel ve otomatize antibiyogram sistemlerinin her ikisi de yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu test yöntemlerinin kalite kontrolleri zor, ancak uygulanmaları kolay ve göreceli olarak daha ucuzdurlar (7).

Bununla birlikte antibiyotik direnç fenotipindeki değişkenlikler nedeniyle antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik olarak değeri sınırlıdır. Farklı izolatlar aynı direnç paternine sahip olabilecekleri gibi, bir izolat plazmid veya transpozonlar aracılığıyla çoklu antibiyotik direnci geliştirebilir (5).

Kalitatif antibiyotik duyarlılıklarına göre (duyarlı/dirençli) yapılan sınıflandırmalar ilişkisiz suşları ayırt etmede yetersizdirler. Bunun yerine, kantitatif antibiyogram yani antibiyotik duyarlılık zon çaplarına göre sınıflama yapmak, antibiyogramın tiplendirebilme gücünü artırır. (6,14). Blanc DS ve ark.'larının bir çalışmasına göre, kantitatif antibiyogram ribotiplendirme kadar kullanışlı bulunmuştur (14).

Sonuç olarak, MRSA'ların tiplendirilmesinde antibiyotipleme tek başına kullanılamaz, ancak bazen endemik veya epidemik bir klonun tanımlanmasında faydalı bir tarama yöntemi olabilir (14).

c) Faj Tiplendirme

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini infekte ederek çoğu kez bakteri hücrelerinin erimesine neden olan virüsler olarak tanımlanmaktadırlar. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmektedirler. Stafilokoklarla ilgili tiplendirme sistemleri arasında sadece faj tiplendirilmesi standardize edilmiştir. "International Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci" tarafından günümüzde kullanımı önerilen 23 adet standart faj vardır (7). *S.aureus*'un epidemiyolojik analizinde bakteriyofaj tiplendirilmesinin yaygın kullanımı 1940'lı yıllarda olmuştur (7,15).

Faj tiplendirme yönteminin dezavantajları stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması, yöntemin zayıf tekrarlanabilirliği ve ayırım gücüdür (4,15).

d) Kapsüler Serotiplendirme

Kapsüler polisakkarit tiplendirmesini *S.aureus*'lar için ilk kez Karakawa ve Vann geliştirmişlerdir (4,7). Yapılan bir çalışmada 11 kapsüler tip tanımlanmış olup, *S.aureus* klinik izolatlarının %85-90'ı tip 5 ve 8 olarak bulunmuştur (16). Yapılan bazı çalışmalara göre diğer bakte-

riyel özelliklerle kapsüller tipler arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Özellikle bazı faj tipleri aynı kapsüller tipi göstermektedirler. MRSA'lar tipik olarak kapsüller tip 5'tir (17-19).

Sonuç olarak, kapsüller tiplendirme düşük ayırım gücüne sahiptir ve epidemiyolojik çalışmalar için kullanışlı bulunmamıştır. Bir diğer dezavantajı tiplendirmede kullanılan reaktiflerin ticari olarak elde edilememesidir (4,5,7)

e) Tüm Hücre Protein Elektroforezi

Tüm hücre protein elektrofrezinde lizostafin aracılığıyla serbestleştirilmiş olan stafilokok proteinleri poliakrilamid jel elektrofrez (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrıştırılırlar. Bu yöntemle yaklaşık 50 protein bantı görüntülenebilir ve tekrarlanabilir paternler oluşur. Çok sayıda bant oluşmasına rağmen ilişkisiz MRSA izolatları arasındaki patern farkları azdır. Bu da zayıf bir ayırım gücüne yol açar. Ancak, bilgisayar yardımıyla bant yoğunluğu da dikkate alındığında daha iyi bir ayırım yapılabilir. Elektrofrez koşullarında meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesi tüm hücre protein elektrofrezinin bir diğer dezavantajıdır (7).

f) İmmunoblot Yöntemi (Immunoblotting)

İmmunoblot yönteminde elektrofrez işlemi sonrası bakteriyel proteinler nitrosellüloz bir membran üzerine aktarılır. Bu işleme "blotting" adı verilir. Membran daha sonra spesifik antikorlar içeren tavşan veya insan serumuyla karşılaştırılır. Membran üzerindeki proteine bağlanmış spesifik antikorların varlığı enzimle işaretli anti-immünglobulinler yardımıyla saptanır (5). İmmunoblot yöntemi, elektrofrez koşullarından diğer protein elektrofrezine dayalı tiplendirme yöntemlerine göre daha az etkilenir. Ayrıca oluşan bant sayısının daha az olması da yorum kolaylığı sağlar (7). Bu yöntem MRSA'ların epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda etkili bir şekilde kullanılabilir (5). Tüm MRSA izolatlarını bu yöntemle tiplendirmek mümkündür. Ancak salgın incelemelerinde ilişkisiz izolatları yeterince ayırt edemeyebilmektedir (7). Tenover'in çalışmasına göre fenotipik yöntemlerin en iyilerinden biri olan immunoblotting, bazı genotipik yöntemlerle kıyas-

lanabilecek kadar iyi sonuçlar vermektedir (6). Bununla birlikte bu yöntem çok az sayıda araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Yaygın olarak kullanılmamasının birkaç nedeni vardır; Birincisi bu yöntem teknik olarak yoğun bir çaba gerektirmektedir. Ayrıca ekstraksiyon işlemi kullanılan yöntem ve spesifik antikorun elde edildiği kaynak gibi teknik faktörlerin etkileri tam olarak tanımlanmamıştır. İkincisi translyasyon, ısı, besiyeri bileşimi, pH gibi bakteriyel üreme koşullarından etkilenmektedir. Son olarak, saptanan bant paternleri komplekstir, küçük farklılıkların ortaya konması ve yorumlanması zordur (5).

g) Multilokus Enzim Elektrofrez (MEE)

Multilokus enzim elektrofrez, metabolik enzimlerin elektrofretik hareketliliklerindeki farklılığın analizine dayanır (5). Enzim hareketinin hızı enzimin aminoasit kompozisyonuna bağlıdır ve tek bir aminoasit değişikliği bile elektrofretik özelliklerdeki değişikliğe bakılarak saptanabilir (7). Enzimlerin "elektromorf" denilen elektrofretik hareketlilik değişiklikleri, tipik olarak enzimleri kodlayan kromozomal genlerdeki allelik değişikliklerden kaynaklanırlar. Böylece farklı elektromorfaların oluşturduğu "elektrofretik tipler" ortaya çıkar (4,5).

Multilokus enzim elektrofrez, *S.aureus* dahil pek çok bakteriyel tür için kullanılabilir. MRSA izolatları için kullanıldığında tiplendirebilme yeteneği ve tekrarlanabilirliği iyidir. Ayırım gücü yöntemde kullanılan enzimlere bağlıdır. Bazı enzimler MRSA'ların çoğunda monomorfiktir. 12 ila 20 değişik enzim kullanılabilir, ancak bunların göreceli olarak ayırım güçleri henüz tam olarak değerlendirilmemiştir (7).

Salgın izolatlarında kullanıldığında, MEE epidemiyolojik olarak ilişkili bakterileri doğru olarak sınıflayabilmektedir. Ancak bazı ilişkisiz izolatları da hatalı olarak ilişkili gruba dahil edebilmektedir (6-7). MEE paternleri göreceli olarak kolay elde edilse de okunması, yorumlanması, kıyaslanması zordur. En iyi çözüm, elde edilen elektrofretik paternlerin bir bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilmesidir (6-7).

h) Zimotiplendirme (Zymotyping)

Zimotiplendirme, MEE'nin bir varyasyonu olup, bakteriyel elastaz enziminin elektroforetik özelliklerinin farklılığına dayanır. *S.aureus*, anoda olan afinitelerine göre A, B ve C olmak üzere üç elastaza sahiptir. MEE'de olduğu gibi bu yöntemde de enzimlerin elektroforezdeki hareketliliklerinde meydana gelen farklılıklara bakılarak izolatların ayrımı yapılır. Bu metodun MRSA ve metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA)'lar için kullanımıyla ilgili deneyimlerin çoğu Branger ve ark.'na aittir (20,21). Bu yöntemle tüm izolatlar tiplendirilebilmektedir ve paternler stabil ve tekrarlanabilir. Ayrım gücü kapsüller tiplendirmeden iyiyse de faj tiplendirmesi veya "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE)'den belirgin olarak daha kötüdür (22-24). Aynı zimotip içinde birkaç genotip olabileceği saptanmıştır, ancak aksi gösterilememiştir. Ayrıca bu yöntemin sonuçlarıyla antibiyotik duyarlılık paternleri arasında uyum yoktur. Kısacası zimotipleme MRSA'ların tiplendirilmesinde yeterli ayrım gücüne sahip değildir ve tarama testi olarak kullanılamayacak kadar uzun bir prosedüre sahiptir (7).

2. Moleküler (Genotipik) Tiplendirme Yöntemleri

Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyarlar. Bu yöntemlerin temel, mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementleri arasındaki farklılığa dayanır. Pek çok yöntemde DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi ya da nükleik asit amplifikasyon (=çoğaltma) işlemi vardır (9,24).

a) Plazmid Analizi

Bakteriyel plazmidler kendini eşletme yeteneğinde olan ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Plazmidler değişik mekanizmalarla kazanılırlar ve genellikle proliferen olan konak suşlar arasında kalıtsal olarak aktarılırlar. Bununla birlikte kendiliğinden plazmid kayıpları da olabilir. Plazmidler genel olarak konak hücre için hayati değildir. Sıklıkla yapılarında mobil genetik elementler

(transpozonlar) bulunan antibiyotik direnç determinanları taşırlar. Yoğun bir antibiyotik kullanımı olduğunda, plazmidler farklı suşlar arasında kolayca yayılırlar ve bir sağlık ünitesinde uzun süre kalıcılıkları devam eder. Plazmid DNA'sının kompozisyonu transpozonların kolayca kaybedilip kazanılması nedeniyle değişir (5). Plazmidler süperkoil, açık halka, lineer veya oligometrik gibi değişik moleküler formlarda olabilirler ve bu formların elektroforetik hareketleri, sayıları ve göreceli yoğunlukları farklılıklar gösterir (5-7).

Plazmid profil analizi teknik olarak basittir ve *S.aureus*'larda uygulanan ilk DNA'ya dayalı tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle plazmid DNA'sı ekstrakte edilir ve daha sonra rutin agaroz jel elektroforeziyle bakterinin taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri belirlenir (5-7). MRSA suşlarının %90'ından fazlasında plazmid bulunmaktadır. (5-7,25). Yöntemin ayrım gücü ve tekrar edilebilirliği ile ilgili problemler hemen hemen tüm çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca plazmid tiplendirilmesine ait bilgilerin yorumu karışıktır (5). Zuccarelli ve ark. bu problemin çözümü için S1 nükleaz kullanımını önermişlerdir (26). Plazmid analizinin ayrım gücü ve tekrar edilebilirliği, plazmidlerin restriksiyon enzimiyle kesilmesi ve oluşan restriksiyon parçalarının sayısı ve büyüklüklerinin analiz edilmesiyle de artırılabilir. Bu işleme "restriction enzyme analysis of plasmids (REAP)" denir. Teknik olarak basittir, az sayıda özel araç, gereç gerektirir ve göreceli olarak hızlı uygulanır (5,8,13).

Plazmid analizine göre tiplendirmedeki problemler, teknik konulardan çok plazmidin biyolojisindeki özelliklerden kaynaklanmaktadır. Plazmidlerin büyüklükleri doğru olarak ölçülse bile, aynı büyüklükteki plazmidler biyolojik farklılığa sahip olabileceklerinden suşlar arasında bu yöntemle ayrım yapılamayabilir. Ayrıca çoğu *S.aureus* izolatında sadece bir veya iki plazmid bulunur ve bu da suş ayrımında yetersiz kalmaktadır (27,28). Aynı kromozomal genotipe sahip ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar, tüm plazmidini kaybetmesi, yeni plazmid kazanması veya plazmid yapısında yeni bir düzenleme nedeniyle çok farklı

niyle çok farklı plazmid profili gösterebilirler. Buna karşın farklı suşlar da aynı plazmid profiline sahip olabilirler. Bütün bunların yanı sıra plazmid çalışmaları, sınırlı bir zamanda ve belli bir yerdeki salgına (örneğin tek bir hastane veya servisteki salgın) ait izolatların kısa sürede değerlendirilmesinde oldukça etkilidir (5).

b) Kromozomal DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi

Kromozomal DNA bir bütün olarak analiz etmek için çok büyüktür. Bu nedenle pek çok genotipik yöntemin temelinde kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleriyle küçük parçalara kesim işlemi vardır. Restriksiyon endonükleazlar çift iççikli DNA'yı özgül tanıma bölgelerinden keserler. Restriksiyon parçalarının sayısı ve büyüklükleri enzim tanıma bölgesi ve DNA kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Restriksiyon parçaları değişik tip jel elektroforez yöntemlerinin kullanımıyla birbirlerinden ayrılabilirler. Aynı enzimle işleme alınmış farklı suşlara ait DNA parçaları kıyaslandığında, elektroforetik hareket ve oluşan parçalardaki farklılıklar ortaya çıkar. Farklı sayı ve büyüklüklerdeki parçaların oluşturduğu profil farklılıklarına "Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)" denir (5). Konvansiyonel restriksiyon enzim analizi (REA)'nde, bakteriyel genomdan endonükleaz enzimi kesisiyle yaklaşık 0,5- 50 kb uzunluğunda yüzlerce parça oluşmaktadır. Farklı suşların REA profilleri de farklıdır. Çünkü suşların DNA dizileri, dolayısıyla da restriksiyon bölgeleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri farklılıklar gösterir (7).

Tüm izolatlar REA ile tiplendirilebilir, ancak yüzlerce banttan oluşan profili, ayrılmayan veya üst üste gelen bantlar nedeniyle yorumlamak zordur. Ayrıca, bant paterni içinde plazmid veya kontamine DNA parçalarını restriksiyon parçalarından ayırmak zordur. Bu problemi ortadan kaldırmak için bilgisayar destekli bir sistem kullanılabilir, ancak bunu yapmak çoğu laboratuvar için zordur. Genelde REA diğer genotipik tiplendirme yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır (5).

c) Southern Blot Analizi

Southern blot analizinde agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırılan restriksiyon parçaları bir nitroselüloz membran üzerine aktarılır. Daha sonra prob adı verilen işaretli bir veya daha fazla sayıdaki oligonükleotide homolog diziyi taşıyan restriksiyon parçalarının varlığı araştırılır (5-7,9). Eğer özgül DNA dizimleri varsa, bunların yeri işaretli DNA problemleri sayesinde gösterilmiş olur. Tüm suşlar bu şekilde tiplendirilebilir ve sonuçlar büyük oranda tekrar edilebilir. Yöntemin ayırım gücü bantların sayı ve büyüklükleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu yöntemde önemli olan uygun probun seçimidir (5,24).

Yine RFLP'ye dayalı bir Southern blot yöntemi olan ribotiplendirmede ise suşların ribozomal operonlarına spesifik problemler kullanılır. Ribozomal operonlar 16S rRNA, 23S rRNA ve ek olarak bir veya daha fazla tRNA'yı kodlayan nükleotid dizilerinden oluşurlar. Bütün stafilokoklar çok sayıda (beş-sekiz) ribozomal operon taşırlar ve bu nedenle de ribotiplendirme ile tiplendirilebilirler (5,7). Ribotipler biyolojik olarak çok stabildirler ve tekrar edilebilir paternler oluştururlar. Ribotiplendirme ve diğer Southern blot analizlerinin performans özellikleri hibridizasyon koşullarının sertliği (stringency), restriksiyon enzimi ve prob seçiminden doğrudan etkilenir. Zaman alıcı ve teknik olarak komplike olan ribotiplendirmede minör bant farklılıklarının ne şekilde yorumlanacağı konusundaki kriterler de henüz standardize edilmemiştir (7). Bir salgında izole edilen tüm izolatlar genellikle aynı ribotipe sahiptirler. Bununla birlikte ilişkisiz suşların sıklıkla bir veya iki bant farklılığıyla aynı paterni gösterebilmeleri ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların da benzer minimal değişiklikler gösterebilmeleri nedeniyle bu yöntemin ayırım gücü ve teknik kullanımı sınırlıdır. Bir çalışmaya göre, ribotiplendirme ile altı ribotipe ayrılan izolatlar PFGE ile 26 pulsotipe ayrılmıştır (29). Ribotiplendirmenin ayırım gücü MEE'den de belirgin bir şekilde daha azdır (5-6).

"Insertion Sequences (IS)"ler ve transpozonlar da stafilokok izolatlarının tiplendirilmesinde prob olarak kullanılmaktadırlar (5,7). MRSA'larda

IS431, IS256, IS1181 gibi birkaç IS elementi bulunmuşsa da tüm suşların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılacak yeterli ayırım gücüne sahip tek bir element bulunamamıştır (5-7). PFGE ile IS tiplendirmenin birlikte kullanımının yararlı olduğu yönünde yayınlar da vardır (25,30). Tn554, spektinomisin direncini taşıyan transpozondur ve MRSA'ların %90'ından fazlasında bulunur (31). Tn554'ün *ClaI* enzimiyle kesilmesinden sonra oluşan bantlar kıyaslanarak da tiplendirme yapılabilir (7). Ancak bu hareketli genetik elementlere dayalı tiplendirme yönteminin potansiyel komplikasyonu, bu hareketli genetik elementlerin bakteriyel kromozom dışında plazmid üzerinde de bulunabilmeleridir (5).

Bunlar dışında metabolik fonksiyonları veya virulans faktörlerini kodlayan genlere ait kromozomal lokuslar da tiplendirmede kullanılabilirler (5-6).

Özetle, ribozomal operonlara ilave olarak pek çok farklı genetik lokusun Southern blot analizi uygulaması *S.aureus*'ların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak özellikle herhangi bir yöntem diğerlerinden daha etkili bulunmamıştır. Southern blot analizi teknik aksesuarları ve ticari olarak elde edilen materyal ve ekipmanlarla kolaylaştırılmışsa da, uzmanlık ve özel araç, gereç gerektirdiğinden yaygın kullanım alanı bulunamamıştır (5).

d) "Pulsed Field Gel Electrophoresis" Yöntemiyle Tiplendirme

Schwartz ve Cantor tarafından 1984'te geliştirilmiş olan "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)" yöntemi agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonudur. Elektriksel alanın periyodik olarak ("pulsed") yer değiştirdiği bu elektroforez yöntemiyle, normal agaroz jel elektroforezi ile ayrılmayan megabaz büyüklüğündeki (10 kb'dan 1,5 Mb'a kadar) DNA parçalarının ayırımını yapmak mümkündür (5,23,32). Bu yöntemde, mikroorganizma önce "plug" adı verilen agaroz bloklar içine gömülür, daha sonra enzimatik lizis ile bakteri duvarı parçalanır ve hücrel proteinler sindirilir. Böylece DNA'nın fiziksel ve kimyasal etkiler ne-

deniyle kırılması önlenmiş olur. Daha sonra izole edilen bu genom yine bloklar içerisinde restriksiyon enzimleriyle kesilir (5,33). Yaklaşık 2800 kilobaz (kb) büyüklükte olan stafilokok kromozomu *SmaI* enzimiyle (CCCGGG tanıma dizisi) kesildiğinde, büyüklüğü 10 ile 800 kb arasında 15-20 DNA parçasından oluşan bir restriksiyon profili ortaya çıkar (5,7).

PFGE'nin iki önemli kısıtlılığı vardır; İlki, agaroz bloklar içine tüm tampon ve enzimlerin yeterince difüze olabilmesi için uzun süren birkaç inkübasyon periyoduna gereksinim vardır. Günümüzde *S.aureus* için işlemler kayda değer bir şekilde kısaltılmış olsa bile, 2 ile 4 günlük zahmetli bir çalışma süresi gerektirir (5,33-34). Ancak blok içinde elde edilen DNA +4°C'de yıllarca stabil kalır ve diğer prosedürler için bu DNA kolayca elde edilebilir (33). Yöntemin ikinci kısıtlılığı, göreceli olarak pahalı araç ve gereç gerektirmesidir (5). Bununla birlikte tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü gibi faktörler nedeniyle çoğu laboratuvarlarda stafilokokların tiplendirilmesinde PFGE tercih edilen bir sistem haline gelmiştir ve günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (5,9,35). Tüm stafilokok izolatları PFGE ile tiplendirilebilir. Diğer restriksiyon endonükleaz enzimine dayalı yöntemlerde olduğu gibi, elde edilen bant paternlerinin tekrar edilebilirliği oldukça yüksektir. Southern blot analizinin her aşamasında belli artefaktlar oluşabilirken PFGE ile elde edilen paternler etidyum bromürle boyanarak basit bir şekilde gösterilebilir. Restriksiyon profilleri göreceli olarak daha basittir ve farklı suşlar arasındaki değişiklikler sıklıkla belirgin şekilde gösterilebilir (5).

Bir salgından elde edilen epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların tanımlanmasında PFGE'nin yüksek etkinlik ve yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bilinmektedir (5). Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların ayırımında kullanılan bir tiplendirme yönteminin ayırım gücü, ancak tekrar edilebilirliğin sınırlarını en uygun şekilde gösteren yorum kriterlerinin kullanımıyla ortaya konabilir (36). Önceleri iki suş, aralarında tek bir restriksiyon parçasının bile farklı olması durumun-

da ayrı genotipler olarak kabul edilmekteydi (37-39). Ancak son yıllarda Tenover ve arkadaşlarının önerdiği yorum kriterleri kullanılmaktadır (40). Bu kriterlere göre ;

a) Aynı sayı ve büyüklükte bantlara sahip izolatlar “ayırtdilemez” olarak,

b) Üç parçaya kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili” olarak,

c) Dört-altı bant farkı gösteren izolatlar “muhtemelen ilişkili” olarak,

d) Yedi ve üzeri bant farklılığında izolatlar “ilişkisiz” olarak kabul edilirler (40).

Tek bir suşa ait izolatlarda minör farklılıklar birkaç farklı genetik olaya bağlı olarak ortaya çıkabilir (40). Nokta mutasyonu sonucu bir restriksiyon bölgesinde kayıp söz konusu olabilir. Bu durumda iki ayrı parça birleşerek daha büyük tek bir parça olarak görülebilir. Kazanılmış yeni bir restriksiyon bölgesi varsa, bu durumun tam tersi ortaya çıkar. Bu nedenle, iki izolat arasında eğer üç parçaya kadar farklılık varsa yakın ilişkili kabul edilir (5). Dört-altı parça farklılığında ise iki bağımsız genetik olay söz konusudur. Bu durumda iki izolat birbiriyle muhtemelen ilişkili kabul edilir. Yedi veya üzerindeki parça farklılığında ise üç veya daha fazla genetik olay söz konusudur ve izolatlar birbiriyle “ilişkisiz” olarak değerlendirilirler (40).

MRSA’ların tiplendirilmesinde PFGE diğer yöntemlerden daha etkili bulunmuştur (29,31,41,42). Ancak, yapılan bazı çalışmalara göre ise farklı merkezlerin PFGE sonuçları birbirleriyle yeterince uyum göstermemiştir (26,43). Buna rağmen, PFGE bugün için MRSA’ların tiplendirilmesinde yaygın olarak ve etkin bir şekilde kullanılan en iyi yöntemdir (5).

e) Polimeraz Zincir Tepkimesine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri

Stafilokokların tiplendirilmesinde standart kabul edilen PFGE’nin uzun zaman ve teknik imkanlar gerektiren bir yöntem olması nedeniyle, bu yöneme karşı alternatif yöntemler aranmıştır. Bunların en önemlisi “Polimeraz Zincir Tepkimesi [Polymerase Chain Reaction (PCR)]”ne dayalı

yöntemlerdir. PCR yönteminin temel özelliği, belirli bir DNA dizisinin hızlı bir şekilde çoğaltılması (ampifikasyonu)dır. Bu yöntemle, 48 saat içerisinde 50 kadar izolatu kolayca tiplendirmek mümkün olmaktadır (5,7,44).

PCR temeline dayanan yöntemlerde öncelikle mikroorganizmanın nükleik asidi elde edilir. Daha sonra nükleik asidin belirli bir bölgesine uygun olarak seçilmiş ve primer adı verilen oligonükleotidler (primerler tipik olarak 18-20 bp büyüklüğündedirler ve amplifiye edilecek DNA dizisine komplementer diziler içerirler) kullanılarak hedef DNA parçası çoğaltılır. Amplikon adı verilen bu PCR ürünleri genellikle 0,5-2 kb büyüklüğündedirler. Daha büyük DNA dizilerinin çoğaltılması zordur. Amplifikasyon için teorik olarak tek bir hedef DNA molekülünün bulunması bile yeterlidir. Amplifikasyon “thermal cycler” adı verilen programlanabilir ısı cihazı yardımıyla küçük plastik tüpler içinde gerçekleştirilir. Cihaz içindeki tüpler her döngüde üç değişik ısıya maruz kalırlar. İlk basamak denatürasyondur ve 94°C’ a dek ısıtılan DNA’nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşme (annealing)dir. Bu basamakta, çoğaltılmak istenen DNA dizisine özgül iki primer, sıcaklığın (55-70°C’ye) düşürülmesiyle, denatürasyon basamağında birbirinden ayrılmış olan kalıp DNA tek ipliklerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Ortama konmuş ve optimum çalışma sıcaklığı 72°C olan *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazı (veya ısıya dayanıklı başka bir DNA polimeraz) bu ısıda primerlerden başlayarak 5’-3’ yönünde DNA sentezi yapar. Üç basamaktan oluşan bu döngünün her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası iki katına çıkarılmış olur. Yani sentezlenen DNA bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve DNA parçaları geometrik olarak artarlar. Yaklaşık birkaç saat içinde gerçekleştirilen 30-40 döngü sonrasında hedef DNA parçasığı yaklaşık 10⁹ kat çoğaltılmış olur. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırılırlar ve bir nükleik asit boyası (örneğin en sık kullanılan etidyum bromür) ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenirler (5,45).

PCR yöntemi, infeksiyon hastalıklarının tanısında yaygın olarak kullanılan ve oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Ancak tek bir lokusun analiz edilmesi epidemiyolojik ayırım için yeterli bilgi sağlamaz. Örneğin mecA geninin saptanması metisilin direnci hakkında bir fikir verebilirse de suşlar arasındaki ilişkinin ortaya konmasında yeterli olmaz. Suşların tiplendirilmesinde hedef dizilerin varlığı veya yokluğunun ötesinde bilgiye ihtiyaç vardır. Bunun için birkaç farklı PCR modifikasyonuna başvurulur (3). MRSA tiplendirilmesinde en çok kullanılan PCR modifikasyonları şunlardır:

i) Koagülaz Geninin PCR-RFLP İle İncelenmesi

Koagülaz üretimi *S.aureus*'un önemli bir virulans faktörüdür. Koagülaz tiplendirme, bu virulans faktörünü kodlayan gene ait spesifik bir bölgenin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan ürünün bir RE enzimiyle kesilmesi temeline dayanır (46). Oluşan PCR ürünü genellikle tek parçadır, ancak bazen iki parça da olabilir (47). Bu yöntemde en sık kullanılan RE AluI'dir ve genellikle dört veya daha az sayıda restriksiyon parçası oluşur. MRSA izolatlarının büyük bir kısmı koagülaz gen PCR ile tiplendirilebilirse de çok az sayıda izolatta orijinal primer seti kullanılmasına rağmen RE ile kesimi yapılacak PCR ürünü elde edilememektedir (47,48). Bu problem daha sonra gerçekleştirilmiş çalışmalarda tekrar gözlenemediğinden, bu yöntemin *S.aureus*'ların tiplendirilmesinde universal olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Sonuçlar oldukça stabildir (47,49,50) ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar bu yöntemle gruplanabilirler (6,46,47). Koagülaz geninin PCR-RFLP ile incelenmesi PFGE yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşük bir ayırım gücüne sahip bulunmuştur (6,47,49,51). Ancak bu dezavantajına karşılık daha hızlı ve daha düşük maliyettedir (51). Ayrıca bant sayısının az olması farklı laboratuvarların elde ettikleri sonuçları karşılaştırmayı kolaylaştırmaktadır (49). Ayırım gücünün artırılması için farklı bir RE enzimi kullanımı veya birden fazla enzimin kombine kullanımı gibi denemeler başarıya ulaşmamıştır (50).

Koagülaz gen tiplendirme, epidemik ve sporadik MRSA'lar arasında ayırım yapmak için de kullanılabilir. Epidemik suşlara özel farklı paternler gösterilebileceğinden bu yöntem bilinen bir suş için tarama testi olabilir (50). Bununla birlikte, tek başına kullanıldığında ve doğrudan klinik örneklerde duyarlılığı çok düşüktür (52).

ii) Protein A Geninin PCR-RFLP İncelenmesi

PCR'a dayalı diğer bir tiplendirme yöntemi olan bu yöntemin hedefi X gen bölgesidir. Bu bölge protein A'yı kodlayan spa genine ait ve yüksek değişkenlik özelliği gösteren bir bölgedir (53). PCR ürünleri RsaI enzimiyle kesildiğinde üç parça oluşur. Bunlardan ikisi değişmez, ancak en büyük parçanın uzunluğu değişkenlik gösterir (53). Bu yöntemin iki ana problemi vardır. Bunlardan ilki ayırım gücünün zayıf olması, diğeri ise sonuçların diğer yöntemlerin sonuçlarıyla uyum göstermemesidir (7).

iii) "Random Amplification of Polymorphic DNA" Yöntemi

"Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)" ile tiplendirme "Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)" olarak da bilinir. Bu yöntemde genomik DNA'ya rastgele bağlanan primerlerin kullanımıyla PCR işlemi gerçekleştirilir. Ortaya çıkan PCR ürünleri elektroforez işlemiyle birbirlerinden ayrılırlar ve görüntülenirler. Oluşan bant paternleri, sayı ve büyüklüklerine göre birbirleriyle karşılaştırılırlar (7).

RAPD ile hemen tüm MRSA'lar tiplendirilebilmekte ve aynı laboratuvar içinde elde edilen sonuçlar tekrarlanabilmektedir (54). RAPD, bir salgın bölgesinde kullanıldığı zaman epidemiyolojik olarak ilişkili mikroorganizmaları sınıflandırabilir ve ilişkisiz olan izolatları ayırabilir (54,55). Bu yöntemin en belirgin avantajı diğer yöntemlere göre oldukça hızlı sonuç vermesi ve teknik olarak basit olması ve tiplendirilecek mikroorganizma ile ilgili genom bilgisine gereksinim göstermemesidir. (55). Ayırım gücü kullanılan primerlerin baz dizilimine ve sayısına bağlıdır. Ancak üç veya daha fazla primer kullanılması hem zaman alıcıdır, hem de bu şekilde bile ayırım gücü PFGE'den daha düşüktür (42,44). Farklı merkez-

lerde yapılan yarı standardize yöntemlerden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, MRSA'lar için RAPD yönteminin tekrarlanabilirliğinin çok zayıf olduğu görülmüştür (54). Bunun nedeni zayıf bantları yorumlamadaki güçlük veya bant ayırımı ve farklılıklarını etkileyen elektroforez koşullarındaki değişiklikler olabilir. Aynı laboratuvarlarda bile farklı zamanlarda yapılan RAPD tiplendirme sonuçları arasında değişiklikler olabilmektedir (44). Tekrarlanabilirliğin düşük olması ve laboratuvarlar arası standardizasyonun zor olması nedeniyle RAPD bir referans yöntem olmak için uygun görülmemektedir. (54). Ancak bölgesel olarak endemik olduğu bilinen bir suş için spesifik primerlerin kullanımıyla hızlı bir tarama testi olarak kullanılabilir.

iv) *Rep-PCR Yöntemi*

Bu yöntem kromozom üzerindeki farklı sayı ve pozisyondaki tekrarlayan dizilere uyan primerlerin kullanıldığı bir PCR yöntemidir. PCR işlemi belirli bölgelere spesifik primerlerle yüksek sertlikte (high stregency) gerçekleştirilir (56). Bu yöntemin tekrarlanabilirliği RAPD'den daha iyidir. MRSA'ların tiplendirilmesinde hangi primer kullanıldığında bu yöntemin daha yararlı olabileceği konusu henüz tam açıklık kazanmamıştır (48).

v) *Multiloküs Dizisi Tiplendirme (MLST) Yöntemi*

Bakteriyel izolatların tiplendirilmesi için yedi internal gen parça dizisinin bir arada kullanıldığı PCR'a dayalı kolay bir işlemdir. Enzimleri kodlayan kromozomal genlerdeki allelik benzerliklere göre bakterilerin gruplandırılmasını sağlar. Enright ve ark. bu yöntemi MRSA ve MSSA izolatlarının tiplendirilmesinde başarı ile kullanmışlardır. PCR için karbamat kinaz (arc), shikimat dehidrogenaz (aro), gliserol kinaz (glp), guanilat kinaz (gmk), fosfatasetil transferaz (pta), trifosfat izomeraz (tpi), asetil koenzim A açıl transferaz (yqi) enzimlerini kodlayan gen loküslerine ait primerler kullanılır. Her yedi loküste pek çok allel olduğundan, izolatların şans eseri aynı allelik profile sahip olmaları muhtemel değildir ve aynı allelik profile sahip izolatlar aynı klonun üyeleri olarak tanımlanabilir. Elde edilen veriler laboratuvarlar arasında kolaylıkla karşılaştırılabilmektedir ve MLST'nin

büyük bir avantajı, alınan sonuçların internet aracılığı ile karşılaştırılabilmesidir (59).

Tiplendirme Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

Bakteriyel enfeksiyona bağlı olduğu düşünülen bir salgının araştırılmasında, salgınla ilişkili suşları tanımlamak ve epidemik olanlarla endemik veya sporadik olan izolatların ayırımı yapmak için tiplendirme yöntemlerine gereksinim bulunmaktadır (8). Kullanılan pek çok tiplendirme yönteminden hangisinin daha iyi performansla 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. Bu nedenle "duyarlılık" ve "özgüllük" gibi universal özelliklerin bu amaçla kullanılması çok uygun değildir. Tiplendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı kriterler şunlardır: (8,9,24).

1)Tiplendirebilirlik: Tiplendirebilirlik, kullanılan yöntemin bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğidir. Bir yöntemin ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olsa bile tür içindeki izolatların yalnızca %50-60'ını tiplendirebiliyorsa epidemiyolojik araştırmalarda kullanımı kısıtlıdır (22).

2)Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik, belirli bir suş ile yapılan tekrarlar arasında aynı sonucun alınabilmesidir. Tekrarlanabilirlik özellikle karşılaştırmaya imkan tanıyan güvenilir veri tabanları oluşturmak için önemlidir. Ancak tiplendirme yöntemlerinde aynı koşullar uygulansa bile farklı günlerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluklar olabilmekte, sonuçların güvenilirliği azalmaktadır. Özellikle hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotiklerle yapılan tedaviler tiplendirme yöntemlerinin tekrarlanabilirliğini etkileyebilmektedirler (22). Bir yöntemin tekrarlanabilirlik ve stabilite düzeyini değerlendirmek için herhangi bir standart bulunmamaktadır. Bu nedenle

de bu özellik açısından yöntemler arasında kıyaslama yapmak zordur (7).

3)Ayrım Gücü: Ayrım gücü, tiplendirme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme özelliğidir. Kullanılacak yöntemin ayırım gücü yüksek olmalı, ortak bir kaynaktan infekte olan kişilere ait izolatlar arasındaki bağlantıyı gösterebilmelidir. Aynı zamanda salgın kaynağından tamamen farklı bir coğrafi bölgeden izole edilen, epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları açık olarak ayırt edebilmelidir. Aynı tür içindeki suşlar arasındaki maksimum ayırım çoğunlukla hiyerarşik bir düzen içerisinde ve en az iki tiplendirme yönteminin kullanılmasıyla başarılabilmektedir. Birinci yöntemle temel grup belirlenirken ikinci yöntemle bu grup içindeki farklı tiplerin birbirinden ayırımı sağlanır. Ayrım gücü tekrarlanabilirlikle ilişkilidir ve tekrarlanabilirlik azaldığında ayırım gücü kaybolur (8,22). Ayrım gücünün değerlendirilmesi için standart ölçü olarak “Simpson’un Farklılık İndeksi” (Simpson’s Index of Diversity) kullanılmaktadır (28,57). Bu ölçünün kullanılması için çok sayıda ilişkisiz organizmanın test edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle de nadir olarak kullanılmaktadır (7).

4)Uygulama Kolaylığı: Uygulama kolaylığı, bir yöntemin araç, gereç ve çözümlerinin maliyeti, teknik ayrıntıları ve yöntemin öğrenilip laboratuvara adapte edilebilmesiyle ilgili bir kriterdir. Tiplendirme yöntemi aynı zamanda basit ve ekonomik de olmalıdır. Çünkü kolay uygulanabi-

lirlikle yaygın kullanım arasında pozitif bir ilişki vardır (22-24).

5)Yorum Kolaylığı: Bir yöntemle ait sonuçlar elde edildikten sonra en önemli iş elde edilen verilerin doğru olarak yorumlanmasıdır. Bunun için ortaya konmuş standart kriterler olmalıdır. Örneğin, PFGE görüntülerinin değerlendirilmesine yönelik genel kabul görmüş kriterler yayınlanmışken, RAPD paternlerinin yorumlanmasında henüz standart bir yaklaşım yoktur (24). Bazı tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 1’de gösterilmiştir.

Yukarıda bahsedilen tiplendirme yöntemlerinden sadece faj tiplendirme yöntemi uluslararası kullanım için standardize edilmiştir. Ancak tiplendirilemeyen izolatların oranının fazla olması ve zayıf tekrarlanabilirlik bu yöntemin temel dezavantajlarıdır. Diğer fenotipik yöntemlerin güvenilirliği ise çok azdır. Buna karşın genotipik yöntemler fenotipik yöntemlerden daha yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliğe sahiptirler. Ancak hiçbir yöntem ideal yöntem olmak için gerekli kriterlere tam olarak uymamaktadır. Özellikle geliştirilen bir yöntemin laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için standardize edilmesi oldukça zordur (7). Genotipleme yöntemlerinin henüz ticari olarak bulunmayışı ve ev yapımı protokollerin kullanımı, çalışmalar arasında standardizasyonu güçleştirmektedir.

Bununla birlikte son zamanlarda PFGE yöntemi MRSA’lar için “altın standart” olarak kabul edilmeye başlanmıştır. PFGE ile tiplendirmenin özellikle bölgesel salgınlarda yüksek ayırım gücü

Tablo 1. Bazı Tiplendirme Yöntemlerinin Karşılaştırılması*

Tiplendirme Yöntemi	Değerlendirme Kriterleri			Yorum Kolaylığı	Uygulama Kolaylığı
	Tiplendirebilme	Tekrarlanabilme	Ayrım Gücü		
Biyotiplendirme	Tüm izolatlar	Zayıf	Zayıf	Orta	Kolay
Antibiyotipleme	Tüm izolatlar	İyi	Zayıf	Kolay	Kolay
Serotiplendirme	Çoğu izolatlar	İyi	Vasat	Orta	Orta
Plazmid analizi	Çoğu izolatlar	İyi	İyi	Orta	Orta
Kromozomal DNA’nın REA	Tüm izolatlar	İyi	İyi	Zor	Orta
RFLP ve DNA Prob Analizi	Tüm izolatlar	Mükemmel	Orta→ Mükemmel	Orta	Zor
PFGE	Tüm izolatlar	Mükemmel	Mükemmel	Orta	Orta
AP-PCR (RAPD)	Çoğu izolatlar	İyi	İyi	Orta	Orta

* 24 nolu kaynaktan alınmıştır.

ve performans gösterdiği ifade edilmektedir (3). PFGE, çok zaman alıcı ve laboratuvarlar arası standardizasyonunun zayıf olmasına rağmen diğer metodlarla karşılaştırıldığında yararlı bir referans yöntemi olmuştur (58).

Sonuç olarak, laboratuvar koşulları ve personel durumu da göz önüne alınarak hızlı yöntemlerden bir grubunu kombine şekilde kullanmak benzer suşları ayırtmak için yararlı olacaktır. Ancak unutulmaması gereken en önemli nokta, bütün tiplendirme yöntemlerinin epidemiyolojik bir araştırmada epidemiyolojik veriler ışığı altında değerlendirilmesi gereken yardımcı araçlar olduğudur.

KAYNAKLAR

- Arpin C, Lagrange I, Gachie JP, Bebear C, Quentin C. Epidemiological study of an outbreak of infection with *Staphylococcus aureus* resistant to lincosamides and streptogramin A in a French hospital. *J Med Microbiol* 1996; 44: 303-10.
- Çetinkaya Y. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hast İnfekt Der* 2000; 4: 205-17.
- Hacek DM, Suriano T, Noskin GA, Kruszynski J, Reisinger B, Peterson LR. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 647-54.
- Mulligan ME, Arbeit RD. Epidemiologic and clinical utility of typing systems for differentiating among strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Cont Hosp Epidemiol* 1991; 12: 20-8.
- 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.
- 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.
- Weller TMA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J Hosp Infect* 2000; 44: 160-72.
- Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington DC: ASM Press, 1999: 116-37.
- Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-9.
- Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 323-6.
- Schwartzkopf A, Karc H, Schmidt H. Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor negative, oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2281-5.
- Wanger AR, Morris SL, Ericsson C. Latex agglutination-negative methicillin resistant *Staphylococcus aureus* recovered from neonate: epidemiologic features and comparison of typing methods. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2583-9.
- Back NA, Linnemann CC, Pfaller NA. Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin resistant *Staphylococcus aureus*: the importance of molecular epidemiology. *JAMA* 1993; 270: 1329-36.
- Blanc DS, Petignat C, Moreillon P, Wenger A, Bille J, Francioli P. Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing. *Infect Cont Hosp Epidemiol* 1996; 17: 654-9.
- Hasçelik G. Hastane infeksiyonlarında laboratuvarın rolü. *Hast İnfekt Der* 1997; 1: 21-30.
- Schlichting C, Branger C, Fournier JM. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 551-5.
- Arbeit RD, Karakawa WW, Vann WF, Robbins JB. Prevalence of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2: 85-9.
- Lee JC, Liu MJ, Parsonnet J, Arbeit RD. Expression of types 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin-1 among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2612-20.
- Sompolinski D, Samra Z, Karakawa WW. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 828-35.
- Branger C, Goulet P. Esterase electrophoretic polymorphism of methicillin sensitive and methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1987; 24: 275-81.
- Branger C, Goulet P. Genetic heterogeneity in methicillin resistant strain *Staphylococcus aureus* revealed by esterase electrophoretic polymorphism. *J Hosp Infect* 1989; 14: 125-34.
- Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Rıza Durmaz, ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, 2nci Baskı. Malatya, 2001: 139-47.
- Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, Li H, Cockerill III FR, Thompson RL, Montgomery SO, Persing DH. Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1347-51.

24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for health-care epidemiologists, *Infect Cont Hosp Epidemiol* 1997; 18: 426-39.
25. Morvan A, Aubert S, Godard C, El Sohl N. Contribution typing method based on IS256 probing of *Sma*I digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1415-23.
26. 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: 97-103.
27. Chambers H. Methicillin resistant in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 781-91.
28. 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.
29. Prevost G, Pottecher B, Dahlet M. Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiologic tool for monitoring methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 1991; 17: 255-9.
30. Yoshida T, Kondo N, Hanifah YA, Hiramatsu K. Combined ribotype, PFGE typing and IS431 typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 1997; 44: 687-95.
31. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, Low DE, Novick RP. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227-30.
32. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Pulsed-field gel electrophoresis. In: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 650-9.
33. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology, In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, Washington DC: American Society of Microbiology, 1993: 563-83.
34. Leonard RB, Mayer J, Sasser M. Comparison of MIDI Sherlock system and pulsed-field gel electrophoresis in characterizing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2723-8.
35. 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; 3: 551-5.
36. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1903-5.
37. Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K. Genomic DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2690-9.
38. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 967-72.
39. Wei MQ and Grubb WB. Typing of Australian methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by pulsed field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1992; 37: 187-92.
40. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
41. Coia JE, Noor HI, Platt DJ. Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and the community. *J Med Microbiol* 1988; 27: 271-9.
42. Saulnier P, Bourneix C, Prevost G, Andremont 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.
43. Boyce JM, Opal SM, Potter-Bynoe G, Medeiros AA. Spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 496-502.
44. 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.
45. Derbentli Ş. Stafilokoklarda ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri. *ANKEM Derg* 1996; 10: 211-9.
46. Goh S, Byrne S, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1642-5.
47. Schwartzkopf A, Karc H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as epidemiological marker. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2407-12.
48. Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K. Analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by a molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms. *Epidemiol Infect* 1995; 115: 419-26.
49. Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2514-20.
50. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1083-9.

51. Nada T, Ichiyama S, Osada Y, Ohta M, Shimokata K, Kato N, Nakashima N. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of coagulase gene to distinguish MRSA isolates. *J Hosp Infect* 1996; 32: 305-17.
52. Lawrence C, Cosseron M, Mimoz O. Use of coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemoth* 1996; 33: 687-96.
53. Frenay HM, Theelen JPG, Schouls LM. Discrimination of epidemic and non epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 846-7.
54. 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, Vaneechoutte 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.
55. 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.
56. van der Zee A, Verbakel H, van Zon J, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of a new epidemicity marker. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 342-9.
57. 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.
58. Cookson B, Aparicio P, Deplano A, Struelens M, Gering R, Marples R. Inter-centre comparison of pulsed field gel electrophoresis for typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1996; 44: 179-84.
59. Enright MC, Nicholas PJD, Catrin ED, Sharon JP, Brian GS. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000, 38 (3): 1008-15.

Geliş Tarihi: 03.07.2003

Yazışma Adresi: Dr. Kenan ŞENER

Gülhane Askeri Tıp Akademisi TSK
Rehabilitasyon ve Bakım Merkezi
Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ANKARA
ksener@rehab.gata.edu.tr