Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 14-27*

Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesinde Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Kökenlerinin Enfeksiyözite-Rezistotip-Genotip Kümelenmesi

Infectivity-Resistotype-Genotype Clustering of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in the Central Blacksea Region of Turkey

Şule KIRCA YILMAZ[1], İbrahim Çağatay ACUNER[2], Birgit STROMMENGER[3], Yüksel BEK[4], Wolfgang WITTE[3]

[1] Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun.
[1] *Giresun University Faculty of Health Sciences, Giresun, Turkey.*

[2] Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[2] *Yeditepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.*

[3] Robert Koch Enstitüsü, Ulusal Stafilokok Referans Merkezi, Wernigerode.
[3] *Robert Koch Institut, Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken, Wernigerode, Germany.*

[4] Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, Samsun.
[4] *Ondokuz Mayis University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Samsun, Turkey.*

Geliş Tarihi (Received): 09.07.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.12.2013

ÖZET

Hastanelerde ve toplum içinde, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) epidemik kökenlerinin prevalansındaki artış, enfeksiyon kontrol önlemleri açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesindeki klinik MRSA izolatlarının, kısa ve uzun dönemli epidemiyolojik özelliklerinin anlaşılabilmesi için, patojenik fenotip (enfeksiyözite, resiztotip) ve genotip (PFGE pulsotipi, SLST *spa* tipi, MLST dizi tipi, eBURST klonal kompleks tipi) özelliklerinin belirlenmesi ve olası bir kümelenme varlığının araştırılmasıdır. Çalışmaya, prospektif olarak, Aralık 2006-Şubat 2007 tarihleri arasında hastanede yatan hastalardan izole edilen, ardışık ve tekrarlardan arındırılmış, 48 MRSA izolatı (18'i kolonizasyon, 30'u hastane enfeksiyonu etkeni) ile tümü hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanan yedi metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatı alınmıştır. İzolatların tanımlaması Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, ABD) ile, in vitro antimikrobiyal duyarlılıkları testleri ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi ve Vitek-2 otomatize sistemiyle yapılmıştır. Eritromisine duyarlı bulunan MRSA izolatlarında (n= 10), PCR yöntemi ile *ermA* geni araştırılmıştır. Tüm izolatlar, *spa* tiplendirme ve PFGE pulsotiplendirme yöntemleriyle tiplendirilmiştir. Farklı *spa* tiplerini temsilen seçilen üç MRSA izolatı ile tüm (n= 7) MSSA

İletişim (Correspondence): *Yrd. Doç. Şule Kırca Yılmaz, Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Yeni Mahalle Erenler Sok. No: 25, Piraziz, Giresun.* ***Tel (Phone):*** *+90 555 491 9360,* ***E-posta (E-mail):*** *sulekirca@yahoo.com*

izolatlarına MLST yöntemiyle tiplendirme yapılmıştır. Farklı *spa* tiplerine ait izolatlar içinde, antibiyotik duyarlılık paternleri birbirinden farklı olan MRSA izolatları arasından seçilen temsilcilerin (n= 8) SCC*mec* tipleri, multipleks PCR yöntemiyle belirlenmiştir. İzolatların, antimikrobiyal direnç paternleri sayısallaştırılarak, standardize antimikrobiyal direnç fenotipleri belirlenmiştir. MRSA izolatlarının, ayırt edici özelliklerinden olan enfeksiyözite, fenotipik ve genotipik özellikleri temelinde oluşan patern gruplarındaki kümelenmeleri, belirli içerme ve dışlama ölçütleri ile istatistiksel analize alınmış ve anlamlılık bakımından incelenmiştir. Çalışmamızda, MSSA izolatlarında üç, MRSA izolatlarında 13 farklı antimikrobiyal direnç fenotipi belirlenmiş ve MRSA izolatlarında 14, MSSA izolatlarında yedi farklı PFGE pulsotipi saptanmıştır. MRSA izolatlarının 10'u, PFGE-pulsotipi ile sporadik tekil kökenler olarak saptanmıştır. MRSA izolatlarının, ikisi (t459, t632) hariç, diğerlerinin t030 *spa* tipinde olduğu belirlenmiş; farklı *spa* tipi temsilcilerinin (n= 3) analizi sonucunda, tek MLST klonal kompleks tipi (CC8) ve tek MLST dizi tipi (ST239) bulunmuştur. Yedi MSSA izolatının ise her birisinin *spa* tipi, MLST dizi tipi ve MLST klonal kompleks tipinin farklı olduğu izlenmiştir (t777-ST5-CC5; t660-ST25-CC5; t153-ST34-CC30; t015-ST45-CC45; t267-ST97-CC97; t377-ST360-CC8; t084-ST15-C15). Sporadik olmayan 38 MRSA izolatının istatistiksel analizinde, Grup-13'te yer alan izolatların (n= 16; enfeksiyöz, rezistotip 14, pulsotip 4; antimikrobiyal direnç skoru= 24), anlamlı düzeyde enfeksiyözite-fenotip-genotip kümelenmesi sergilediği saptanmıştır ($p< 0.001$). MRSA izolatlarının 27'sinde azalmış teikoplanin duyarlılığı (MİK= 4 µg/mL) saptanmıştır. Global olarak, MLST-CC8, MLST-ST239, t030 *spa* tipi MRSA izolatlarının, genellikle eritromisine dirençli olması beklenmesine karşın, duyarlı olan 10 izolatın altısında *ermA* geninin bulunduğu gösterilmiş; bu genlerin nokta mutasyonu veya delesyon nedeniyle işlevsiz olabileceği düşünülmüştür. Antimikrobiyal duyarlılık paternleri birbirinden farklı olan MRSA izolatları arasından seçilen sekiz temsilci suşun SCC*mec* tipleri, tip III olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, Orta Karadeniz bölgesi hasta popülasyonunu temsil eden hastanemizde saptanan *S.aureus* izolatlarının, enfeksiyözite, antimikrobiyal direnç fenotipi ve klonal genotip bakımından, istatistiksel olarak anlamlı kümelenme sergilediği ortaya konmuştur ($p< 0.001$). Baskın olan MRSA klonunun, beş büyük pandemik MRSA klonundan biri olan, epidemik ST239 klonu olduğu ve nozokomiyal MSSA izolatlarının uzun dönemli klonal çeşitlilik sergilediği belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, hastane enfeksiyonlarına yol açan çeşitli *S.aureus* kökenlerinin, bölgesel, ulusal ve uluslararası uzun dönemli sürveyans çalışmaları için veri sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus, spa tipi, MLST, PFGE, moleküler epidemiyoloji; hastane enfeksiyonu, Türkiye.*

ABSTRACT

The increase in the prevalence of epidemic strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and community requires special attention of infection control. The aim of this study was to determine the pathogenic phenotype (i.e. infectivity and resistotype) and genotypic characteristics (i.e. PFGE-pulsotyping, SLST-*spa* typing, MLST-sequence typing, eBURST-clonal complex detection algorithm) of clinical MRSA isolates in the Central Blacksea region of Turkey, in order to understand their short- and long-term epidemiological and evolutionary dynamics, and to investigate any probable presence of a significant clustering. This prospective study included consecutive but non-repetitive 48 MRSA isolates (of them 18 were colonized strains and 30 were causes of nosocomial infection) and seven methicillin-susceptible *S.aureus* (MSSA, all were isolated from nosocomial infection), collected between December 2006-February 2007 period from hospitalized patients. Identification of the isolates were performed by Vitek-2 automated system (BioMérieux, USA), and in vitro antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution method and Vitek-2 automated system. The MRSA isolates found susceptible to erythromycin (n= 10) were further investigated for the presence of *erm*A gene by the PCR method. All the strains were typed by *spa*-typing and PFGE-pulsotyping methods. Among the isolates with different *spa*-types, representatives were selected (3 MRSA, 7 MSSA) and typed with MLST typing method. Among the isolates with different *spa*-types, representatives with different antimicrobial susceptibility patterns were selected (n= 8), and SCC*mec* types were determined by the multiplex PCR method.

Antimicrobial resistance patterns of the isolates were digitized to get standardized antimicrobial resistance phenotypes. Clustering of MRSA isolates in pattern groups on the basis of discriminatory characteristics, namely infectivity, phenotype and genotype were statistically analyzed with specific inclusion and exclusion criteria. As a result, three different antimicrobial resistance phenotypes were found in MSSA isolates, whereas 13 were identified in MRSA isolates. In MSSA isolates, seven different PFGE-pulsotypes were detected, as compared to 14 pulsotypes in MRSA isolates. Among MRSA isolates, 10 sporadic strains with single PFGE-pulsotypes were detected. All MRSA isolates, with two exceptions (t459, t632), were of t030 *spa*-type; in the MLST analysis of the representatives of different *spa*-types (n= 3), a single type of MLST-clonal complex (CC8) and single MLST-sequence type (ST239) were identified. Each of the seven MSSA isolates yielded different *spa*-types, MLST-clonal complex types and MLST-sequence types (t777-ST5-CC5; t660-ST25-CC5; t153-ST34-CC30; t015-ST45-CC45; t267-ST97-CC97; t377-ST360-CC8; t084-ST15-C15). In the statistical analysis of 38 non-sporadic MRSA isolates, the isolates in Group-13 (n= 16; infectious, resistotype 14, pulsotype 4; antimicrobial resistance score= 24) displayed significant infectivity-phenotype-genotype clustering ($p< 0.001$). In 27 of the MRSA isolates, decreased susceptibility to teicoplanin (MIC= 4 µg/mL) was detected. Although, global MRSA isolates belonging to MLST-CC8, MLST-ST239, t030 *spa*-type were usually expected to be resistant to erythromycin, 10 such strains were erythromycin susceptible. However, *erm*A gene was found in six of these 10 strains, leading to a conclusion that the *erm*A gene of these isolates might be dysfunctional due to a point mutation or deletion. Selected representatives of MRSA isolates with different antimicrobial susceptibility patterns (n= 8) were detected to be SCC*mec* type III. In conclusion, *S.aureus* isolates in the patient population of our hospital representing the Central Blacksea region showed statistically significant clustering in infectivity, antimicrobial resistance phenotype and clonal genotype ($p< 0.001$). The dominant MRSA clone was ST239 which was one of the five major pandemic MRSA clones. Nosocomial MSSA isolates displayed long-term clonal diversity. This study produced regional evolutionary-epidemiological data that may support further regional, national and international long-term surveillance studies of *S.aureus* strains.

Key words: *Staphylococcus aureus, spa type, MLST, PFGE, molecular epidemiology; nosocomial infection; Turkey.*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus hem toplum kökenli hem de nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan önemli bir bakteriyel patojendir[1]. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonları morbidite ve mortalitenin artmasına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve sağlık kuruluşlarının ekonomik yükünün artmasına neden olur[2]. MRSA'nın saptanmasından sonra bulaş yollarının gösterilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkili olup olmadığının belirlenmesi için genetik tiplendirmeye gereksinim vardır[3]. MRSA'nın dünya çapındaki yayılımı birkaç klonun üzerinden ilerlemektedir. Bugüne kadar İber (ST247-IA), Brezilya (ST239-IIIA), Macar (ST239-III), New York/Japonya (ST5-II) ve Pediatrik (ST5-IV) klonları olmak üzere beş büyük pandemik MRSA klonu bildirilmiştir[4].

Epidemiyolojide tiplendirmenin amacı; epidemik klonu, epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlardan ayırmaktır[5,6]. MRSA izolatlarının epidemik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler; PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) pulsotiplendirmesi, *spa* (Staphylococcal Protein A gene) tiplendirme, SCC*mec* (Staphylococcal Chromosomal Casette *mec*) tiplendirme ve MLST (Multilocus sequence typing) olarak sayılabilir[2]. Özellikle MLST, yüksek maliyet ve fazla iş gücü gerektirdiğinden, MRSA'nın

rutin sürveyansı için uygun olmamakla birlikte[7-9], *S.aureus*'un zaman boyutu bakımından uzun dönemdeki ve fiziksel biyocoğrafya boyutu bakımından büyük coğrafi bölgelerdeki epidemiyolojisini ve evrimini gösterebilen ve bu amaçlara yönelik araştırmalarda kullanılabilen önemli bir moleküler epidemiyolojik tiplendirme aracıdır[10,11]. PFGE pulsotiplendirme gibi DNA bant patern analizi temelindeki tiplendirme yöntemleriyle karşılaştırıldığında, genomik polimorfizmlerin dizi analizi ile saptanmasının önemli bir avantajı, sonuçların net bir şekilde yorumlanabilmesi ve taşınabilmesidir[5]. MLST ve *spa* tiplendirme ile belirlenen klonal gruplar arasında iyi bir korelasyon vardır. Bir MLST dizi tipinin *spa* genindeki tekrar sayısı, bazen *spa* tiplendirme ile MLST'den daha iyi çözünürlük sağlayacak derecede çeşitlidir[7]. PFGE pulsotiplendirme sonucunda elde edilen bant sayısının 10-30 adet gibi nispeten az olmasına karşın, özellikle laboratuvarlar arası çalışmalarda, sonuçların yorumlanmasında sorunlar vardır. Elektroforez koşullarındaki küçük farklar bile, her bantın jel üzerinde katettiği uzaklığı değiştirdiğinden, farklı jel görüntülerinin karşılaştırılması karmaşık bir durum oluşturur. Buna rağmen, PFGE pulsotiplendirme, salgınların belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Tekrarlanabilirliği ve ayırıcı gücü yüksek olan bu yöntem, MRSA tiplendirmede halen altın standart olup, salgınlar ve hastaneler arası geçişlerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılır[4,12,13].

Hastanemiz, Orta Karadeniz bölgesinde, Samsun ve çevresindeki üç buçuk milyondan fazla kişilik nüfusa hizmet eden bir bölge hastanesi niteliğindedir. Bu çalışmanın amacı, MRSA enfeksiyonları bakımından hiperendemik olan hastanemiz ve hizmet sunduğu bölge için, enfeksiyon kontrolüne yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere, lokal, ulusal ve global ölçekte karşılaştırılabilir olan ve uzun dönemli evrimsel-epidemiyolojik bilgi veren temel sürveyans verilerini sağlamaktır. Bu amaçla, hastanemizde izole edilen *S.aureus* kökenlerinde, göreceli olarak daha kısa dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan PFGE pulsotiplendirme ve *spa* tiplendirme yöntemlerine ek olarak, özellikle uzun dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan MLST yöntemi de kullanılarak, hastanemiz ve bölgemiz ile ilgili eksiksiz, saklanabilir, taşınabilir ve karşılaştırılabilir nitelikte moleküler epidemiyolojik veri elde edilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

S.aureus İzolatları ve İlişkili Verilerin Toplanması

Çalışmaya, Aralık 2006-Şubat 2007 tarihleri arasında bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından 18'i kolonizasyon, 30'u hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen 48 MRSA suşu ile hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen 7 metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşu dahil edildi. İzolatlar arasından, 30 gün içinde tekrar izole edilen ve antibiyotik duyarlılık fenotipinde iki ve daha az değişiklik gösterenler çalışmaya alınmadı[14]. MRSA suşları, trakeal aspirat (n= 16), yara (n= 16), kan (n= 10), beyin omurilik sıvısı (n= 2), balgam (n= 2), konjunktiva sürüntüsü (n= 1) ve kateter (n= 1); MSSA suşları ise, kan (n= 4), balgam (n= 1), trakeal aspirat (n= 1) ve idrar (n= 1) izolatları idi.

İzolatlar Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, ABD) ile tür düzeyinde tanımlandı ve çeşitli antibiyotiklere karşı (eritromisin, fosfomisin, fusidik asit, gentamisin, klindamisin,

levofloksasin, linezolid, moksifloksasin, nitrofurantoin, norfloksasin, oksasilin, penisilin, kinopristin/dalfopristin, rifampisin, siprofloksasin, teikoplanin, tetrasiklin, tobramisin, trimetoprim/sülfametoksazol ve vankomisine) in vitro duyarlılık testleri, DIN 58940 (Deutsches Institut für Normung) yöntemi referans alınarak, sıvı mikrodilüsyon ve Vitek-2 otomatize sistemiyle yapıldı. Teikoplanin duyarlılığının belirlenmesi için EUCAST tarafından bildirilen direnç sınır değerleri (≤ 2 µg/ml duyarlı, > 2 µg/ml dirençli; EUCAST-ECOFF= 2 µg/ml; Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. http://www.eucast.org) kullanıldı.

İzolatların antimikrobiyal direnç paternleri sayısallaştırılarak (test edilen 20 antibiyotiğin her biri için; duyarlı= 0, orta duyarlı= 1 veya dirençli= 2; örn. 22220202022202202200) standardize antimikrobiyal direnç fenotipleri (rezistotipleri) belirlendi[15]. Her bir izolatın, antimikrobiyal direnç skoru, sayısallaştırılmış antibiyotik direnç paternindeki her bir basamağın değerleri toplanarak (örn. 2 + 2 + 2 + 2 + 0 + 2 + 0 + 2 + 0 + 2 + 2 + 2 + 0 + 2 + 2 + 0 + 2 + 2 + 0 + 0= 26) hesaplandı[16]. Duyarlılık testleri sonucunda eritromisine duyarlı bulunan MRSA izolatlarında (n= 10), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *erm*A geni araştırıldı. Tüm izolatlar, *spa* tiplendirme ve PFGE pulsotiplendirme yöntemleri ile tiplendirildi. Farklı *spa* tiplerine ait izolatlardan, temsilci seçimi yapılarak (3 MRSA, 7 MSSA), MLST yöntemiyle tiplendirme yapıldı. Farklı *spa* tiplerine ait izolatlar içinde, antibiyotik duyarlılık paternleri birbirinden farklı olan MRSA izolatları arasından seçilen temsilcilerin (n= 8) SCC*mec* tipleri, multipleks PCR yöntemi ile belirlendi[17].

Moleküler Yöntemler

DNA ekstraksiyonu: *S.aureus* bakteri hücrelerinden DNA eldesi için "DNeasy Tissue Kit" (Qiagen, Almanya) kullanıldı.

***Spa* tiplendirme:** *S.aureus* izolatlarından, protein A genine (*spa*) ait polimorfik X bölgesi *spa*-1113f (5'-TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C-3') ve *spa*-1514r (5'-CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT-3') primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Bu amaçla, "PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads" (Amersham-Pharmacia Biotech, ABD) hazır kiti kullanıldı. Dizi tepkimeleri, "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems, ABD) ile gerçekleştirildi. Ardından örnekler, otomatik dizi analizi aygıtı (ABI 377 Sequencer; Applied Biosystems, ABD) kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek DNA dizileri elde edildi. Sonrasında, *spa* tipleri, "Ridom StaphType Software Version 1.3" (Ridom GmbH, Almanya) ile belirlendi[7].

Multilokus dizi analizi: *S.aureus* izolatlarında "housekeeping" genleri [*arc* (karbamat kinaz), *aro* (şikimat dehidrogenaz), *glp* (gliserol kinaz), *gmk* (guanilat kinaz), *pta* (fosfat asetiltransferaz), *tpi* (triosefosfat izomeraz), *yqi* (asetil koenzim A asetiltransferaz)] amplifiye edildi. "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems, ABD) ve PCR için kullanılan primer seti ile her gen bölgesi için ayrı dizi karışımları hazırlandı ve dizi tepkimeleri gerçekleştirildi. Ardından, örnekler, otomatik DNA dizi analizi aygıt sistemi (ABI 377 Sequencer; Applied Biosystems, ABD) kapiller elektroforezinde yürütülerek DNA dizileri elde edildi. Elde edilen DNA dizisi verileri, MLST internet sitesinde (http://www.mlst.net/) yer alan *S.aureus* MLST veri

tabanında değerlendirildi ve yine bu sitede yer alan eBURST algoritması (*Based Upon Related Sequence Types* elektronik yazılımı) kullanılarak MLST dizi tipleri ve MLST klonal kompleks tipleri belirlendi[18].

PFGE: *Sma*I makrorestriksiyon paternleri, Yetkin ve arkadaşlarının[19] uyguladıkları yöntemin laboratuvarımız koşullarında modifiye edilmesiyle uygulandı. Elektroforez koşulları, "CHEF-Mapper Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (Bio-Rad, ABD) sisteminde, başlangıç vuruş süresi 5.3 saniye, bitiş vuruş süresi 34.9 saniye, vuruş açısı 120°, akım 6 V/m, sıcaklık 14°C, süre 20 saat olarak ayarlandı. Her jelde, *S.aureus* NCTC 8325 standart suşu kontrol olarak kullanıldı. Grup analizi, "BioNumerics" yazılım programı (Applied Maths, Belçika) ile yapıldı. Jel-içi ve jeller-arası kıyaslamalar, %0.5 optimizasyon ve %1 tolerans ayarları ile gerçekleştirildi. PFGE pulsotipleri ve alttipleri, izolatlar arasındaki Dice benzerlik katsayısı verilerinin UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritması ile kümelendirilmesi yoluyla çizilen dendrogram üzerinde, Dice %80 benzerlik eşik değeri ile oluşturulan gruplarla (kümelerle) tanımlandı. Dendrogramda, ilk izolattan başlanarak, kümeler içindeki farklı pulsotipler numaralandırıldı.

İstatistiksel Analiz

MRSA izolatlarının, ayırt edici özellikleri olan, enfeksiyözite (kolonizasyon veya nozokomiyal enfeksiyon), fenotip (rezistotip) ve genotip (pulsotip) özellikleri temelinde oluşan patern gruplarındaki kümelenmeleri, belirli içerme ve dışlama ölçütleri ile istatistiksel analize alındı ve istatistiksel anlamlılık bakımından incelendi.

İstatistiksel analizden dışlama ölçütleri: MSSA kökenleri, tekil genotiplere sahip olduğundan ve örnek sayısı küçük olduğundan, istatistiksel analiz dışında bırakıldı. MRSA pulsotiplerinden epidemiyolojik olarak ilişkisiz nitelikteki -sporadik- tekil pulsotipler ve yakın dönemli ilişkililikteki düşük ayırt edici gücü nedeniyle, *spa* tipi, MLST klonal kompleks tipi ve MLST dizi tipi değişkenlerinin verileri istatistiksel analizden çıkartıldı.

İstatistiksel analizde içerme ölçütleri: Verilerin listelemesinde, eldeki veri seti içinde, kümelendirme için ayırt edici olabileceği düşünülen ve olası risk faktörleri arasında bulunan şu değişkenler içerme ölçütleri olarak belirlendi: klinik özellik olarak; enfeksiyözite, laboratuvar özellikleri olarak; antimikrobiyal direnç fenotipi ve genotipik özellik olarak pulsotip.

İstatistiksel yöntem ve anlamlılık değerlendirmesi: İzolatlar, enfeksiyözite, antimikrobiyal direnç fenotipi ve pulsotip özellikleri bakımından oluşan özgül paternlerine göre, özdeş patern gruplarında kümelendirildi. İstatistiksel analizde, nonparametrik bir test olan ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık bakımından, %99 güven aralığında $p < 0.001$ ölçütü kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, MSSA izolatlarında 3, MRSA izolatlarında ise 13 farklı antimikrobiyal direnç fenotipi belirlenmiş ve MRSA izolatlarında 14, MSSA izolatlarında ise 7 farklı PFGE pulsotipi saptanmıştır (Tablo I ve II, Şekil 1 ve 2). İki olguda farklı kabul edilen ikişer izolatın, antimikrobiyal direnç fenotiplerinin ve pulsotiplerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür.

Tablo I. *MSSA Izolatlarının Genotipik Özellikleri*

Sıra no	İzolat no	*Spa* tipi	MLST dizi tipi	MLST klonal kompleks
1	07-02704	t777	ST5	CC5
2	07-02705	t660	ST25	CC25
3	07-02706	t153	ST34	CC30
4	07-02707	t015	ST45	CC45
5	07-02708	t267	ST97	CC97
6	07-02709	t377	ST630	CC8
7	07-02710	t084	ST15	CC15

MRSA izolatlarının 10'u, PFGE pulsotipi ile sporadik tekil kökenler olarak saptanmıştır. İki izolat dışında (t459, t632) MRSA izolatlarının hepsinde *spa* tipi t030 olarak belirlenmiştir. Farklı 3 *spa* tipinden birer temsilci seçilerek MLST yöntemi uygulandığında, tek MLST klonal kompleks tipi (CC8) ve tek MLST dizi tipi (ST239) tespit edilmiştir.

Çalışmaya alınan 7 MSSA izolatının ise her birisinin *spa* tipi, MLST dizi tipi ve MLST klonal kompleks tipinin farklı olduğu izlenmiştir (t777-ST5-CC5; t660-ST25-CC5; t153-ST34-CC30; t015-ST45-CC45; t267-ST97-CC97; t377-ST360-CC8; t084-ST15-C15).

Sporadik olmayan 38 MRSA izolatının istatistiksel analizi sonucunda, grup 13'te yer alan 16 izolatın, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde enfeksiyözite-fenotip-genotip kümelenmesi sergilediği belirlenmiştir ($p< 0.001$). MRSA izolatlarının 27'sinde, azalmış teikoplanin duyarlılığı (MİK= 4 µg/ml; MİK> EUCAST Epidemiyolojik direnç sınır değeri, ECOFF= 2 µg/ml) saptanmıştır. Global olarak, MLST-CC8, MLST-ST239, t030 *spa* tipi MRSA izolatlarının, genellikle eritromisine dirençli olması beklenmesine karşın, fenotipik olarak duyarlı saptanan 10 izolatın 6'sında, *erm*A geni belirlenmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık paternleri birbirinden farklı olan MRSA izolatları arasından seçilen 8 izolatın (4'ü eritromisine duyarlı *erm*A pozitif, 1'i eritromisine duyarlı *erm*A negatif, 3'ü eritromisine dirençli) SCC*mec* tiplerinin, tip III olduğu saptanmıştır.

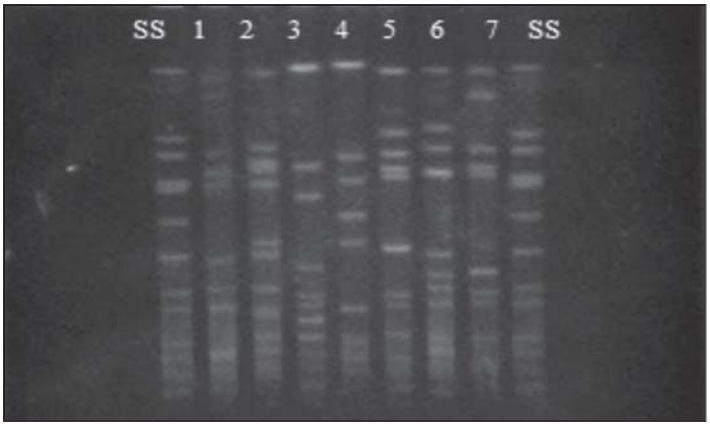
TARTIŞMA

S.aureus kökenlerinin epidemiyolojik analizinde kullanılan *spa* tiplendirme ve MLST gibi dizi analizine dayalı olan tiplendirme yöntemleri, PFGE pulsotiplendirme gibi bant paterni tabanlı yöntemlere göre, uygulama kolaylığı, tekrarlanabilirlik, sonuçların taşınabilirliği ve karşılaştırılabilirlik gibi avantajlara sahiptir. *S.aureus* izolatlarının tiplendirilmesinde halen "altın standart" olan PFGE pulsotiplendirme salgın araştırmalarında kullanılmakla birlikte, filogenetik analizlerdeki kullanımı sorgulanmaktadır[8]. Bir bakteriyel popülasyon içinde, genomun henüz tanımlanmayan bölgeleri veya bazı lokuslar yüksek oranda değişkenlik gösterebilir; sonuçta gözlenen varyasyon, çeşitli genetik mekanizmalardan kaynaklanabilir; bu durum uzun dönemli salgınlar için yanıltıcı olabilir. Global olarak yayılmış tek bir MRSA klonundaki genetik değişiklikleri açıklayamadığı için PFGE pulsotiplendirme, uzun dönemli epidemiyolojik araştırmalarda, gereğinden fazla ayırt

Tablo II. *Sporadik Olmayan MRSA Izolat Gruplarının Enfeksiyözite, Antimikrobiyal Direnç Fenotipi, Pulsotip ve Antimikrobiyal Direnç Skoru Özellikleri*

Sıra no	İzolat no	Enfeksiyözite (NE/C)	Fenotip (PT, F)	Pulsotip (P)	Ds (Rs)	Grup kodu
1	07-2726	1	3	9	24	1
2	07-2712	2	4	1	20	2
3	07-2713	1	7	1	19	3
4	07-2735	1	7	1	19	3
5	07-2734	1	7	2	19	4
6	07-2715	2	8	2	22	5
7	07-2718	2	8	2	22	5
8	07-2716	2	8	1	22	6
9	07-2687	1	8	2	22	7
10	07-2724	2	9	1	23	8
11	07-2683	1	10	4	25	9
12	07-2714	2	11	1	25	10
13	07-2688	1	12	1	24	11
14	07-2681	1	13	1	23	12
15	07-2711	1	13	1	23	12
16	07-2682	1	14	4	24	13
17	07-2684	1	14	4	24	13
18	07-2685	1	14	4	24	13
19	07-2690	1	14	4	24	13
20	07-2691	1	14	4	24	13
21	07-2692	1	14	4	24	13
22	07-2693	1	14	4	24	13
23	07-2694	1	14	4	24	13
24	07-2696	1	14	4	24	13
25	07-2731	1	14	4	24	13
26	07-2697	1	14	4	24	13
27	07-2699	1	14	4	24	13
28	07-2700	1	14	4	24	13
29	07-2701	1	14	4	24	13
30	07-2702	1	14	4	24	13
31	07-2703	1	14	4	24	13
32	07-2717	2	14	4	24	14
33	07-2720	2	14	4	24	14
34	07-2721	2	14	4	24	14
35	07-2722	2	14	4	24	14
36	07-2725	2	15	9	23	15
37	07-2698	1	15	4	26	16
38	07-2719	2	16	1	26	17

NE: Hastane enfeksiyonu (kod 1); C: Kolonizasyon (kod 2): Ds: Antimikrobiyal direnç skoru (Rs: Resistance score).

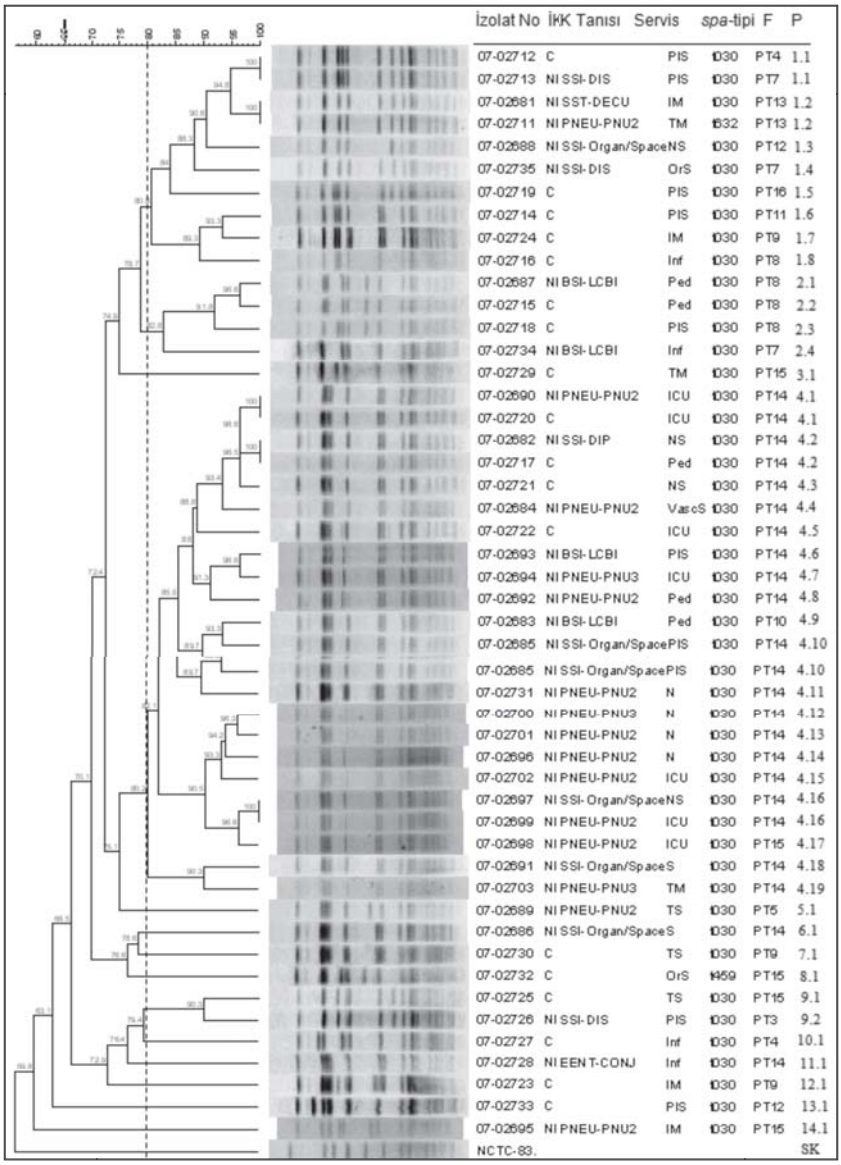


Şekil 1. *MSSA izolatlarının PFGE pulsotiplendirme ile elde edilen bant paternleri [Her bir MSSA izolatı farklı pulsotip paternine (≥ 5 bant farkı) sahiptir. SS: Standart suş].*

edici olabilir. Bu koşullarda, PFGE pulsotiplendirme ve PCR tabanlı bir tekniğin birlikte kullanılması, mikroorganizmaların genotiplendirmesinde daha uygundur[3,5,8].

PFGE pulsotiplendirme ile gösterilebilen genetik olgular, MLST ve *spa* tiplendirme ile incelenen genlerdeki genetik olgulara göre daha sık gerçekleşir[20]. "Housekeeping" genleri, bakterinin varlığını sürdürmesi için, yaşamsal önem taşıdığından, genellikle hasar verici (deleterious) nitelikte oluşan genetik değişiklikler tolere edilemez ve mutasyona uğrayan alt popülasyon üyeleri popülasyondan elenirler. Bu durumda, popülasyon genelinde bu genlerin dizisi uzun zaman korunmuş olur ve uzun dönemli ilişkililiği göstermekte başarılı olur. MLST, "housekeeping" genlerindeki düşük genetik olgu sayısına bağlı olarak *S.aureus*'un uzun dönemli popülasyon ilişkilerinin, kökeninin ve evriminin araştırılmasında çok değerli bir yöntemdir[9,21]. Büyük ölçüde *S.aureus*'un evriminin araştırılmasında kullanılan MLST'nin aksine, *spa* tiplendirme, rutin araştırmalarda kullanılmak üzere ortaya çıkmış bir yöntem olup, ayırt edici gücü MLST'den daha yüksektir[8]. Bizim çalışmamızda da, 48 MRSA izolatı içinde, üç *spa* tipi, bir MLST dizi tipi ortaya çıkmıştır.

Diğer moleküler tekniklere göre uygulanması ve yorumlanması daha kolay ve daha hızlı bir yöntem olan *spa*-tiplendirmenin, *S.aureus* epidemik izolatlarının izleminde ve sporadik olarak ortaya çıkan klonların oranının belirlenmesinde önemi büyüktür[7,21]. Buna karşın tek bir polimorfik genin, bir epidemiyolojik belirteç olarak ayırt edici gücü sınırlıdır; *spa* dizileri göreceli olarak stabil olduğundan ve yakın dönemli ilişkililiği yeterince ayırt edemediğinden, farklı *spa* tiplerine ait izolatlar genellikle epidemiyolojik olarak ilişkisizdir. Ancak aksini söylemek her zaman olanaklı değildir, zira izolatlar aynı *spa* tipine sahip olsa bile, epidemiyolojik olarak ilişkisiz olabilir[3,5,8]. Bu nedenle, *spa* tiplendirmenin, yakın dönemli ilişkililik analizi için, PFGE pulsotiplendirmeden daha az ayırt edici olduğu düşünülmektedir. Tang ve arkadaşları[22], iki yıllık dönemde, yatan hastalardan izole edilen aynı *spa* tipine sahip 20 izolatın, birbiriyle ilişkili fakat ayırt edilebilen PFGE pulsotip paternleri sergilediğini göstermişler ve *spa* tiplendirmenin yetersiz olduğu durumlarda özellikle uzun süren nozokomiyal salgınlarda, PFGE tiplendirmenin kullanılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2. *MRSA izolatlarının SmaI makrorestriksiyon analiziyle elde edilen DNA paternlerinin Dice benzerlik katsayısı kullanılarak çizilen dendrogramı. (SSI-DIS: Derin insizyonel sekonder cerrahi alan enfeksiyonu, SST-DECU: Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu-Dekübit ülseri, PNEU-PNU2: Spesifik laboratuvar bulguları ile tanı konan nozokomiyal pnömoni, SSI-Organ/Space: Cerrahi alan enfeksiyonu-Organ/Boşluk, BSI-LCBI: Laboratuvar tarafından kanıtlanmış bakteriyemi, SSI-DIP: Derin insizyonel primer cerrahi alan enfeksiyonu, PNEU-PNU3: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastada gelişen pnömoni, EENT-CONJ: Konjunktivit, PIS: Plastik cerrahi, IM: Dahiliye, TM: Göğüs Hastalıkları, NS: Beyin cerrahisi, OrS: Ortopedi, Inf: İnfeksiyon/Enfeksiyon hastalıkları, Ped: Pediatri, ICU: Yoğun bakım ünitesi, VascS: Kardiyovasküler cerrahi, N: Nöroloji, S: Genel cerrahi, TS: Göğüs cerrahisi, F(PT): Antibiyotik direnç fenotipi, SK: Standart köken, P: Pulsotip.*

Birbiriyle ilişkili izolatların, PFGE pulsotip paternlerinde, tek banda ait küçük değişikliklerin yorumlanması önemli bir tartışma konusudur. Peacock ve arkadaşlarının[23] PFGE pulsotiplendirme ve MLST'yi kıyaslayan çalışmalarında, aynı hastalara ait *S.aureus* izolatlarının aralarında, bir ya da iki bant değişikliği belirlenmiştir. Bu bulgu, tek bir PFGE pulsotip bandındaki değişikliklerin, fazla ayırt edici olabileceğini düşündürür[7,23].

Strommenger ve arkadaşları[8], MLST/eBURST verilerini referans göstererek, tiplendirme yöntemleri arasındaki uyumu değerlendirmişler ve MLST ile CC-121, CC-22, CC-45 klonal komplekslerine ve ST426, ST59, ST81 ve ST1 dizi tiplerine ait izolatların, MLST, *spa* tiplendirme ve PFGE pulsotiplendirme yöntemlerinin her üçüyle de, özdeş kümelendirme sonuçları verdiğini görmüşlerdir. Bu klonal komplekslerin ve dizi tiplerinin her biri, *spa* tiplendirme/BURP ve *Sma*I makrorestriksiyon analizinde belirli tekil gruplara karşılık gelmiştir. Wisplinghoff ve arkadaşları[2], 15 yıl boyunca izole edilen MRSA izolatlarının moleküler evrimini araştırdıkları çalışmalarında, MLST, *spa* tiplendirme ve SCC*mec* tiplendirme yaptıkları izolatların ST'lerinin, PFGE pulsotip paternleriyle uyumlu çıktığını, ilk beş yılda toplanan izolatların %96'sının ST239-III olduğunu ve ortak bir PFGE pulsotipi profili gösteren diğer ST'lerin aksine, bizim sonuçlarımızdaki gibi, ST239 içindeki izolatların, farklı PFGE pulsotip profillerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Robinson ve Enright'a[24] göre, evrimsel olarak ST239 ve ondan köken alanlar, CC8 içerisinde filogenetik olarak ayrı ve klinik olarak önemli olan bir kolu temsil ederler. ST239 mozaik kromozomu, ata köken ST30'dan alınan ve replikasyon orijinini kapsayan 557 kb uzunluğunda bir parça ile ata köken ST8'den alınan ve replikasyon terminalini kapsayan 2220 kb uzunluğunda bir parça içermektedir[2,24]. Faria ve arkadaşları[25] da, *S.aureus* için kullanılan temel tiplendirme yöntemlerinin uyumunu araştırdıkları çalışmalarında, MRSA ve MSSA gruplarının verilerini karşılaştırdıklarında, MLST, *spa* tiplendirme ve PFGE pulsotiplendirme tekniklerinin her üçünün de, MSSA izolatları için daha ayırt edici olduğunu görmüşlerdir. Bu durumun, MSSA suşlarının, MRSA suşlarından daha fazla genetik çeşitlilik göstermesiyle uyumlu olduğunu ve MRSA'nın, SCC*mec* elementinin kazanılmasıyla, MSSA'dan türediği hipotezini desteklediğini, dolayısıyla, *spa* tiplendirmenin tek başına MSSA izolatları için yeterli olduğunu, ancak, MRSA için, PFGE pulsotiplendirme ve *spa* tiplendirmenin kombine kullanımının daha ayırt edici olacağını ileri sürmüşlerdir.

Alp ve arkadaşlarının[26], Türkiye'deki MRSA prevalansını ve genetik ilişkisini araştırdığı çok merkezli bir çalışmada; farklı bölgelerdeki MRSA prevalansının %12-75 arasında değiştiği, baskın *spa* tipinin t030 olduğu ve MLST uygulanan farklı pulsotiplerin ST239 olduğu bildirilmiştir[26]. Ergon ve arkadaşları[27] da, kan kültürlerinden izole edilen ve en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan dokuz MRSA kökeniyle gerçekleştirdikleri çalışmalarında, benzer bir sonuca ulaşmışlardır. Dominant olarak saptadıkları köken, t030 *spa* tipine sahiptir ve ST239-IIIA klonunun üyesidir. Bozdoğan ve arkadaşlarının[28] yaptığı çok merkezli bir diğer çalışmada ise, altı yıllık süreçte tüm merkezlerde en sık saptanan MRSA klonunun (%76-100) t030 *spa* tipine sahip olduğu ve MLST uygulanan pulsotip A suşlarının çoğunun (%91.4) ST239 olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, MRSA suşlarının üçü dışında, diğerlerinin t030 olduğu ve hepsinin ST239 olduğu belirlenmiştir. İzolatların servislere göre dağılımına bakıldığında, en sık plastik cerrahi servisinden (~%19) ve yoğun bakım biriminden (~%15) izole edildiği

görülmüştür. Cerrahi servisler, MRSA enfeksiyonu için risk faktörüdür. Yoğun bakım hastaları, yüksek antibiyotik kullanım oranının neden olduğu yüksek seçici baskıdan dolayı, MRSA enfeksiyonu açısından en riskli gruptur[29]. Bizim çalışmamızda da, MRSA izolatlarının en sık izole edildiği ikinci birim, yoğun bakım birimidir.

Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda eritromisine duyarlı bulanan izolatların bazılarında, *erm*A geni saptanmıştır. Bu durumun fenotipe yansımamasının, olasılıkla, bu gende ortaya çıkan bir mutasyondan (nokta mutasyonu veya delesyon) kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu genotip-fenotip uyumsuzluğunun, dizi analizi ve gerekirse klonlama ve ekspresyon analiziyle araştırılması planlanmıştır.

MRSA izolatlarında, MLST ile tek genotip, *spa* tiplendirme ile üç genotip ve PFGE pulsotip sonuçlarının analizi ile 14 farklı pulsotipin elde edilmesiyle, bizim çalışmamızda da, ayırt edici gücü en yüksek olan yöntemin PFGE pulsotiplendirme, ayırt edici gücü en düşük olanın ise, MLST olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, örneklemimizin üç aylık bir dönemi yansıtması nedeniyle, genetik çeşitlilik, diğer çalışmalara kıyasla sınırlı kalmış olabilir. Çalışmamızın sonucuna göre, hastanemizde baskın olan köken, MLST ST239 klonu ve PFGE pulsotip 14 olup, kolonizasyon potansiyeli ve antibiyotiklere karşı direnci daha yüksektir. Hastanemizde baskın tek klon ve pulsotipin olması, hastanelerde sadece birkaç epidemik MRSA klonunun hakim olduğunu gösteren daha önceki çalışmalarla uyumludur[1]. Sonuçlarımızdaki farklı *spa* tiplerinden t632, t030 *spa* tipi olan bir izolatla aynı PFGE pulsotip paternine sahiptir. Wisplinghoff ve arkadaşları[2] aynı ST veya PFGE paternini gösteren fakat *spa* tipleri farklı olan izolatlarda, *spa* bölgesindeki insersiyon ya da delesyonların, PFGE pulsotip paternini etkilemediğini belirtmişlerdir. Bizim sonucumuz da, bu bulgu ile uyumlu bulunmuştur.

Örneklemimizde yer alan MSSA izolatlarının ise, her birinin farklı bir *spa* tipi ve MLST dizi tipi sergilemesi, MSSA izolatları için *spa* tiplendirmenin ayırt ediciliğinin yeterli olduğunu desteklemektedir. MLST ile elde ettiğimiz MSSA MLST dizi tiplerinden ST630 (12-3-1-1-4-4-3), ST239 (2-3-1-1-4-4-3)'un tek lokus varyantıdır; her ikisi de CC8'in içinde yer alır. CC8 içinde, ST8, ST239, ST247 ve ST254 olmak üzere dört majör epidemik hastane kaynaklı MRSA klonu bulunmaktadır[8,30]. Bizim hastanemizde, en sık görülen ST239; pandemik Macar klonudur (ST239-III). Dünya nüfusunun %60'ından fazlasına sahip olan büyük Asya bölgesindeki hastane kaynaklı MRSA kökenlerinin en az %90'ından ST239 sorumludur[31]. CC8 içinde yer alan MRSA izolatlarının, hastane kaynaklı dominant klonlar olduğu ve tek lokus bakımından farklı olan kökenlerin lokal çeşitlilik ve uzun dönemli devamlılık gösterdiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda, hastane enfeksiyonu etkeni MRSA izolatları arasında, Grup-13'ün (n= 16, p< 0.001, enfeksiyöz, rezistotip 14, pulsotip 4; antimikrobiyal direnç skoru= 24) devamlılık açısından en başarılı köken olduğu, fenotip 14, 15 ve 16'da 4 µg/ml (> ECOFF) düzeyinde azalmış teikoplanin duyarlılığı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, hastanemizde izole edilen *S.aureus* kökenlerinde, zaman boyutu bakımından göreceli olarak daha kısa dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan PFGE pulsotiplendirme, orta dönemli evrimsel-epidemiyolojik bilgi sağlayan *spa* tiplendirme tekniklerine ek olarak, özellikle uzun dönemli evrimsel bilgi sağlayan MLST yöntemi kullanılarak, hastanemiz ve bölgemizle ilgili eksiksiz, kalıcı, taşınabilir ve karşılaştırılabilir nitelikte moleküler evrimsel ve epidemiyolojik veri elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cho DT, Cha HY, Chang HH, et al. Risk factors for specific methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Korean hospital. J Antimicrob Chemother 2006; 57(6): 1122-7.
2. Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, et al. Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the metropolitan area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. J Clin Microbiol 2005; 43(11): 5445-51.
3. Te Witt R, van Belkum A, van Leeuwen WB. Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: an update. Expert Rev Mol Diagn 2010; 10(4): 375-80.
4. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; 13(3): 222-35.
5. Witte W, Strommenger B, Werner G. Diagnostics, Typing and Taxonomy, pp: 371-80. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds), Gram-Positive Pathogens. 2006, 2nd ed. ASM Press, Washington.
6. Struelens MJ. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(5): 581-5.
7. Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5442-8.
8. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2533-40.
9. Saunders NA, Holmes A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol Biol 2007; 391: 71-85.
10. Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC. Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics 2001; 17(12): 1230-1.
11. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, et al. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1830-7.
12. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512-30.
13. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. Braz J Infect Dis 2003; 7(1): 32-43.
14. Peterson LR, Brosette SE. Hunting health care-related infections from the clinical laboratory: passive, active, and virtual surveillance. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 1-4.
15. Acuner IC. Theoretical framework on the uses of standardised antibiotic phenotype and pattern indexes. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 4): 1278.
16. Denamur E, Tenaillon O, Deschamps C, et al. Intermediate mutation frequencies evolution of multidrug resistance in *Escherichia coli*. Genetics 2005; 171(2): 825-7.
17. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(7): 2155-61.
18. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1008-15.
19. Yetkin G, Kuzucu Ç, Durmaz B, Durmaz R, Çizmeci Z, İşeri L. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infections in a university hospital. Turk J Med Sci 2009; 39(6): 959-68.

20. Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK, Raghunath D. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore, South India. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3198-202.
21. Palavecino E. Clinical, epidemiological, and laboratory aspects of methicillin-resistant S*taphylococcus aureus* (MRSA) infections. Methods Mol Biol 2007; 391: 1-19.
22. Tang YW, Waddington MG, Smith DH, et al. 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(4): 1347-51.
23. Peacock SJ, de Silva GD, Justice A, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3764-70.
24. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(12): 3926-34.
25. Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 2008; 46(1): 136-44.
26. Alp E, Klaassen CH, Doganay M, et al. MRSA genotypes in Turkey: persistence over 10 years of a single clone of ST239. J Infect 2009; 58(6): 433-8.
27. Ergon MC, Biçmen M, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi. ANKEM 2010; 24(2): 65-70.
28. Bozdoğan B, Yıldız O, Oryaşın E, et al. t030 is the most common *spa* type among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Turkish Hospitals. Mikrobiyol Bul 2013; 47(4):571-81.
29. Rijnders MI, Deurenberg RH, Boumans ML, et al; Antibiotic Resistance Surveillance Group. Population Structure of *Staphylococcus aureus* strains isolated from intensive care unit patients in the Netherlands over an 11-year period (1996 to 2006). J Clin Microbiol 2009; 47(12): 4090-5.
30. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(11): 7687-92.
31. Neela V, Ghasemzadeh Moghaddam H, van Belkum A, Horst-Kreft D, Mariana NS, Ghaznavi Rad E. First report on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of *Spa* type T037, Sequence Type 239, SCC*mec* type III/IIIA in Malaysia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29(1): 115-7.