

HASTANE İZOLATI STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENÇ VE AMİNOGLİKOZİD MODİFİYE EDİCİ ENZİM GENLERİNİN MULTİPLEKS-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF METHICILLIN RESISTANCE AND AMINOGLYCOSIDE MODIFYING ENZYME GENES IN HOSPITAL STAPHYLOCOCCI BY MULTIPLEX-POLYMERASE CHAIN REACTION

**Mustafa ÖZYURT*, Barış SAREYYÜPOĞLU*, Nurittin ARDIÇ*,
Uğur İLGA*, Ali ERDEMOĞLU*, Tunçer HAZNEDAROĞLU***

ÖZET: Bu çalışmada, yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda metisilin ve aminoglikozid direncinin fenotipik olarak disk difüzyon yöntemi ve genotipik olarak multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Genotipik olarak aminoglikozid modifiye edici enzimleri (AME) kodlayan *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* ve *ant(4)-Ia* genlerinin yanısıra metisilin direnç geni *mecA* araştırılmıştır. Çalışmada 19'u *S. aureus* ve 30'u koagülaz negatif stafilocok (KNS) olmak üzere toplam 49 izolat incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle oksasiline dirençli olarak saptanan 34 (%69.4) izolatın 33'ünde (%97) *mecA* geni pozitif bulunmuş, oksasilin direnci ile *mecA* geni varlığı arasındaki ilişkinin *S. aureus*'larda %100, KNS'larda ise %95.7 düzeyinde olduğu gözlenmiştir. AME genlerinden *aac(6')/aph(2'')* 22 izolatta (%44.9), *ant(4)-Ia* 7 izolatta (%14.3) ve *aph(3')-IIIa* 2 izolatta (%4.1) pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmada, genotipik olarak *mecA* geni pozitif izolatların %72.7'sinde bir veya daha fazla AME gen birlikteliği gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Stafilocok, metisilin, aminoglikozid modifiye edici enzim, multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT: This study was conducted to investigate the presence of methicillin and aminoglycoside resistance encoding genes by multiplex-polymerase chain reaction (PCR) and by phenotypic methods in staphylococci isolated from inpatients' clinical specimens. The presence of *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* and *ant(4)-Ia* genes encoding aminoglycoside modifying enzymes (AME) and *mecA* gene encoding methicillin resistance were genotypically investigated. A total of 19 *S. aureus* and 30 coagulase negative staphylococci (CNS) were tested. Thirty four (69.4%) of the isolates were found to be resistant to oxacillin with disk diffusion test, 33 (97%) of which were found to harbour *mecA* gene. The correspondance between oxacillin resistance and presence of *mecA* gene was found to be 100% in *S. aureus* isolates, while it was 95.7% in CNS. Twenty two (44.9%), 7 (14.3%)

* GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

and 2 (4.1%) isolates were found to harbour *aac(6'')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* and *ant(4')-Ia* AME genes, respectively. At least one or more AME genes were detected in 72.7% of *mecA* positive isolates.

Key words: *Staphylococci*, *methicilin*, *aminoglycoside modifying enzyme*, *multiplex-polymerase chain reaction*.

GİRİŞ

Nozokomiyal enfeksiyonların önemli patojenlerinden biri metisiline dirençli stafilokoklardır^{1,2}. Stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik ekspresyonu, inokulüm hacmi, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyerinin pH'sı ve tuz konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğinden duyarlılık testlerinin uygulanmasında hatalar olabilmektedir^{3,4}. Bununla birlikte metisiline dirençli stafilokoklar, beta-laktamların yanı sıra aynı zamanda aminoglikozidler ve makrolidler gibi diğer antibiyotiklere de dirençli olabilmektedirler⁵. Antibiyotik direncinin önemi göz önüne alındığında, direnç profillerinin belirlenmesi için daha hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır.

Stafilokoklarda metisilin direnci, beta-laktam antibiyotikler için düşük afinite gösteren penisilin bağlayıcı bir protein (PBP) olan PBP 2a'nın aşırı üretimine bağlı olarak şekillenmektedir. PBP 2a'yı kodlayan *mecA* geni, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklar (MRKNS)'da yüksek düzeyde homoloji göstermekte ve PBP 2a'dan farklı olarak üreme koşullarından bağımsız saptanabilmektedir. Bu nedenle, *mecA* geninin saptanması stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde uygun bir moleküler tanı yöntemi olarak bildirilmektedir⁶.

Aminoglikozid direncinin ana mekanizması, plazmid ya da transpozonlarda bulunan genlerin eksprese ettiği aminoglikozid modifiye edici (AME) enzimler (aminoglikozid fosfo-transferaz, asetil-transferazlar, nukleotidil-transferazlar) tarafından aminoglikozidlerin inaktive edilmesi şeklindedir. *aac(6'')/aph(2'')* geni tarafından kodlanan bifonksiyonel AAC(6'')/APH(2'') enzimi, stafilokoklarda en sık rastlanan AME'dir. Diğer AME enzimler ise, *aph(3')-IIIa* tarafından kodlanan APH(3')-III ve *ant(4')-Ia* tarafından kodlanan ANT(4')-I'dir⁶.

Bu genlerin saptanmasında kullanılan yöntemler arasında özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Southern blot hibridizasyonu ve makrorestriksiyon yöntemlerine göre daha hızlı, duyarlı ve özgül olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir⁷. Multipleks-PCR, aynı test tüpünde birden fazla gen bölgesinin bir arada incelenmesine olanak sağladığından çeşitli antibiyotiklere karşı genotipik direncin belirlenmesinde daha hızlı ve güvenilir olarak kullanılan bir tekniktir⁸. Bu çalışmada da, multipleks-PCR tekniği kullanılarak stafilokok izolatlarında AME ve *mecA* genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Standart Suş ve Bakteri İzolatları: Çalışmada, yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden (kan, yara, idrar, katater ve sonda ucu, vb) izole edilen toplam 49

stafilokok izolatu kullanıldı. Bu izolatların 19'unu *S. aureus*, 30'unu ise koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lar oluşturdu. İzolatların tanımlanmasında rutin konvansiyonel yöntemler uygulandı. Çalışmada negatif kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 ile *mecA* geni içeren SR 27 (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edildi) ve MRSA CAP 011 24 (ABD kaynaklı) kullanıldı. İzolatlar ve standart suşlar %20 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonu içerisinde -70°C'de saklandı.

Antibiyotik Direncinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi: Bu amaçla, izolatların oksasilin ile birlikte gentamisin, tobramisin, kanamisin, amikasin ve netilmisine karşı duyarlılıkları, National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS)'in önerdiği kurallar dikkate alınarak Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile incelendi (8). Bunun için, 0.5 McFarland standardına uygun olarak hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton Agar yüzeyine inoküle edildikten sonra oksasilin (1 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), kanamisin (30 µg), netilmisin (30 µg) ve tobramisin (10 µg) diskleri yerleştirilerek, 35°C'de inkübasyona bırakıldı. Aminoglikozidler için 16-18 saatlik inkübasyon sonrası, oksasilin için ise 24 saatlik inkübasyonu takiben zon çapları ölçülerek değerlendirme yapıldı.

Bakteriyel DNA İzolasyonu: Çalışma öncesinde izolatlardan DNA izolasyonu için çalışma koşullarımıza en uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla, kaynatma yöntemi⁹, fenol-kloroform ekstraksiyonu¹⁰ ve ticari olarak hazır Qiagen DNA ekstraksiyon kiti¹¹ olmak üzere 3 farklı yöntem uygulandı. Çalışmada en uygun DNA izolasyon yönteminin belirlenmesinde, her üç yöntemle elde edilen DNA'lar, 16S rDNA'nın 420 baz çift (bp)'lik bölgesini amplifiye eden primerlerle, Strommenger ve arkadaşları¹²'nin bildirdiği PCR protokolü ile test edildi.

PCR Primerleri ve Multipleks-PCR Protokolü: Çalışmada kullanılan primerlere ait oligonükleotid dizilimleri Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: Çalışmada Kullanılan Primerlere Ait Oligonükleotid Dizilimleri

Hedef genler		Oligonükleotid dizilimleri*	Çoğaltılması istenen bölgenin büyüklüğü
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	S**	GAA GTA CGC AGA AGA GA	491 bp
	A**	ACA TGG CAA GCT CTA GGA	
<i>aph(3')-IIIa</i>	S	AAA TAC CGC TGC GTA	242 bp
	A	CAT ACT CTT CCG AGC AA	
<i>ant(4')-Ia</i>	S	AAT CGG TAG AAG CCC AA	135 bp
	A	GCA CCT GCC ATT GCT A	
<i>MecA</i>	S	CCT AGT AAA GCT CCG GAA	314 bp
	A	CTA GTC CAT TCG GTC CA	

* Oligonükleotid dizilimleri IONTEK firmasından temin edilmiştir.

** S: Sense, A: Anti-sense

Çalışmamızda, Choi ve arkadaşları¹¹'nin bildirdiği Multipleks-PCR yöntemi modifiye edilerek uygulandı. PCR karışımı, primerler 0.4 μ M, dNTP'ler 200 μ M ve $MgCl_2$ 3mM final konsantrasyonlarda olacak şekilde toplam 25 μ l'lik hacimlerde hazırlandı. Bu karışıma 2 μ l ekstrakte edilmiş bakteri DNA'sı eklendi. Hazırlanan örnekler daha önceden belirlenmiş ve "thermal cycler"da (iCycler, BIO-RAD, İtalya) programlanmış PCR protokolü ile çalışıldı. İnkübasyon ısı ve süreleri ile döngü sayısını içeren temel PCR protokolü olarak; 95°C'de 5 dk.'lık bir ön denatürasyon işleminden sonra, 30 döngü, 95°C'de 2 dk. denatürasyon, 54°C'de 1 dk. primer bağlanması, 72°C'de 1 dk. polimerizasyon aşamalarını takiben 72°C'de 7 dk.'lık son polimerizasyon oluşturuldu.

Amplifiye edilen örnekler 100 V'luk sabit akımda agar jel elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra oluşan bantlar transillüminatörde (BIO-RAD) incelenerek dijital kamera (Kodak) ile görüntülendi.

BULGULAR

Çalışmada incelenen toplam 49 stafilokok izolatının 34'ünde (%69.4) disk difüzyon yöntemiyle oksasilin direnci saptanmıştır. Ayrıca izolatların 23'ü (%46.9) gentamisine, 23'ü (%46.9) kanamisine, 24'ü (%49) tobramisine, 16'sı (%32.7) amikasin, 3'ü (%6.1) netilmisine dirençli bulunmuştur. Oksasilin dirençli izolatların 11'i *S. aureus*, 23'ü KNS olarak belirlenmiştir. Çalışmada 27 (%55.1) stafilokok izolatının en az bir adet aminoglikozide karşı fenotipik olarak direnç gösterdiği ve 11 MRSA izolatının tamamının (%100) aynı zamanda gentamisine de dirençli olduğu saptanmıştır. Oksasilin direnci baz alınarak izolatlarda fenotipik olarak gözlenen aminoglikozid direnç dağılımı Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II: *S. aureus* ve KNS'larda Metisilin Direncine Bağlı Aminoglikozid Direnç Dağılımları

İzolatlar*	Toplam n (%)	Gentamisin n (%)	Tobramisin n (%)	Kanamisin n (%)	Amikasin n (%)	Netilmisin n (%)
MSSA	7 (14.6)	0	0	0	0	0
MRSA	11 (22.9)	11 (100)	9 (81.8)	9 (81.8)	9 (90.9)	0
MSKNS	7 (14.6)	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)	0	0
MRKNS	23 (47.9)	10 (43.5)	13 (56.5)	12 (52.2)	7 (30.4)	3 (13)
Toplam	49**	23 (46.9)	24 (49)	23 (46.9)	16 (32.7)	3 (6.1)

* MSSA: Metisiline duyarlı *S. aureus*; MRSA: Metisiline dirençli *S. aureus*; MSKNS: Metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok; MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok.

** Metisiline orta derecede duyarlı bir *S. aureus* izolatı tabloya dahil edilmemiştir.

Çalışmada, 3 farklı DNA ekstraksiyon yönteminin karşılaştırılması amacıyla, rastgele seçilen 10 *S. aureus* ve 10 KNS izolatından Qiagen kiti, fenol kloroform ve kaynatma yöntemleri ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. PCR testleri sonucunda, Qiagen kiti ve fenol kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen DNA'ların

tümünde (20/20) PCR ile pozitif sonuç alınırken, kaynatma yönteminde test edilen DNA'ların %60'ında (12/20) bantlar görülmüştür. Nunes ve arkadaşları⁹'nın önerdiği kaynatma yöntemi kullanıldığında multipleks PCR testinin toplam süresi 4 saat, Qiagen kitleriyle¹¹ 6 saat ve fenol-kloroform ekstraksiyonu uygulandığında 7 saat sürmüştür. Her üç yöntemle elde edilen DNA'lar 3 ay sonra tekrar kontrol edildiğinde, Qiagen kiti ve fenol kloroform yöntemiyle elde edilen DNA'ların tamamı PCR pozitif sonuç verirken, kaynatma yöntemiyle elde edilen DNA'lardan ancak yarısında (6/12) aranan bantlar saptanabilmektedir.

AME ve *mecA* genlerinin multipleks-PCR'ında amplifikasyonu takiben elektroforez işlemi sonrası agaroz jelde aranan direnç genlerine özgül bantlar (135, 242, 314 ve 491 bp) görüntülenmiştir. Bu testte özgül olmayan hiçbir amplifikasyon bandı gözlenmemiştir (Şekil 1).

Fenotipik olarak oksasiline dirençli olduğu belirlenen 34 izolatın 33'ünde (%97) *mecA* geni saptanmıştır. Bunlar arasında MRSA izolatlarının %100'ü *mecA* geni içerirken, MRKNS'lerde bu oranın %95.7 düzeyinde olduğu gözlenmiştir. AME genlerinden *aac(6'')/aph(2'')* 22 izolatta (%44.9), *ant(4)-la* 7 izolatta (%14.3) ve *aph(3')-IIIa* 2 izolatta (%4.1) pozitif olarak bulunmuştur (Tablo III).

Tablo III: Stafilokok İzolatlarında Metisilin Direncine Göre Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimleri Kodlayan Genlerin Dağılımı

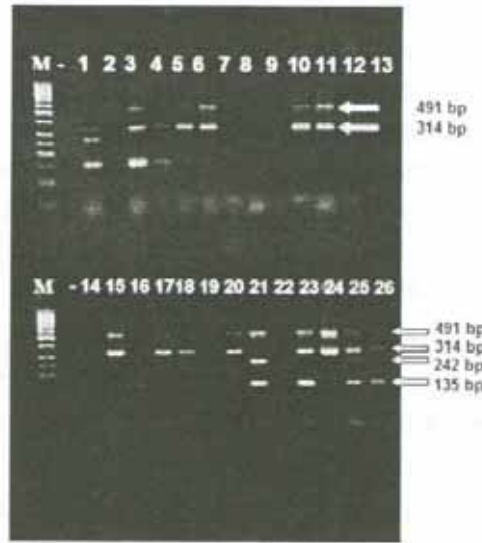
Direnç genleri	MSSA n= 7 (%)	MRSA n=11 (%)	MSKNS n=7 (%)	MRKN Sn=23 (%)	Toplam n=49 (%)
<i>aac(6'')/aph(2'')</i>	0	11 (100)	0	11 (47.8)	22 (44.9)
<i>aph(3')-IIIa</i>	0	1 (9.1)	0	1 (4.3)	2 (4.1)
<i>ant(4)-la</i>	0	0	0	7 (30.4)	7 (14.3)
<i>MecA</i>	0	11 (100)	0	22 (95.7)	33 (67.3)

Çalışmada, genotipik olarak metisilin dirençli izolatların %72.7'sinde en az bir aminoglikozid direnç geni gözlenmiştir.

Stafilokok izolatlarına ait oksasilin direnci ile *mecA* geni arasındaki korelasyon incelendiğinde, oksasilin duyarlı izolatların hiçbirinin *mecA* geni içermediği gözlenmiştir. Oksasiline dirençli olduğu belirlenen *S. aureus* izolatlarının tamamında (11/11) *mecA* geni saptanırken, oksasilin dirençli 23 KNS izolatının 22'sinde (%95.7) bu genin varlığı belirlenmiştir.

Gentamisin direnci ile *aac(6'')/aph(2'')* geni varlığı arasındaki korelasyon Tablo IV'de gösterilmiştir.

S. aureus'larda fenotipik olarak gentamisin direnci gözlenen izolatların tamamı (%100) aynı zamanda genotipik olarak dirençli bulunurken, KNS'larda bu direnç 12 izolatın 8'inde (%66.7) gözlenmiştir. Uyumsuzluk, fenotipik olarak dirençli bulunan ancak direnç geni içermediği saptanan 4 izolatla birlikte, fenotipik olarak duyarlı olup direnç geni saptanan 3 izolatla birlikte toplam 7 izolatta görülmüştür.



Şekil 1: AME ve metisilin direnç genlerine özgül bantların agaroz jeldeki görünümü
(M: Moleküler ağırlık belirleyicisi)

Tablo IV: Gentamisin Direnci ile *aac(6'')/aph(2'')* Geni Varlığı Arasındaki Korelasyon

İzolatlar	Gentamisin	<i>aac(6'')/aph(2'')</i> geni	
		Pozitif sayı	Negatif sayı
<i>S. aureus</i>	11 (dirençli)	11	0
	7 (duyarlı)	0	7
KNS	12 (dirençli)	8	4
	18 (duyarlı)	3	15

TARTIŞMA

Metisiline dirençli stafilokokların belirlenmesinde kültüre dayalı yöntemler genellikle güvenilir olsa da, günümüzde *mecA* geninin PCR ile saptanması altın standart yöntem olarak tanımlanmaktadır⁶. Moleküler teknikler arasında, özellikle multipleks PCR, tek bir reaksiyon içerisinde birden fazla geni saptayabilmesi nedeniyle, birçok antibiyotiğe karşı genotipik direncin daha hızlı ve güvenilir bir biçimde ortaya konulmasında avantaj sağlamaktadır. Stafilokokal enfeksiyonlarda metisilin direncini kodlayan genle birlikte diğer genlerin varlığının da multipleks PCR gibi yöntemlerle araştırılması, çoklu direncin ortaya çıkarılmasında önem taşımaktadır^{5,9,11-14}.

Bu çalışmada, stafilokokal DNA izolasyonunda tercih edilen 3 farklı yöntem (kaynatma, Qiagen kitleriyle DNA ekstraksiyonu ve fenol kloroform ekstraksiyonu) karşılaştırıldığında, en hızlı sonucun kaynatma yöntemiyle alındığı, bu yöntemin kolay uygulanabilen ve ekonomik olduğu, ancak tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve elde edilen DNA'nın uzun süre saklanması açısından diğer iki yöntemle göre dezavantajları

olduğu görülmüştür. Fenol kloroform ve Qiagen kitleriyle ekstraksiyon arasında tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve DNA saklanması açısından fark gözlenmemiştir. Fenol kloroform ekstraksiyonunun daha uzun sürmesine karşılık, Qiagen kitleriyle ekstraksiyona göre düşük maliyeti nedeniyle çalışmada fenol kloroform yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmada, Choi ve arkadaşları¹¹'nin uyguladığı multipleks PCR yöntemi modifiye ve standardize edilerek uygulanmıştır. Araştırmacıların önerdiği yöntemde, multipleks PCR'da 100 µl'lik son PCR karışım hacimleri kullanılırken, bu çalışmada hacim 25 µl'ye indirilerek PCR sarf kullanımı azaltılıp daha ekonomik bir yöntem geliştirilmiştir. Modifiye edilen multipleks PCR yönteminin standardizasyonunda Henegariu ve arkadaşları¹⁵'nin bildirdiği kriterler dikkate alınmıştır.

Çalışmada, disk difüzyon yöntemiyle 34'ü (%69.4) oksasiline dirençli olarak saptanan izolatların 33'ünde (%97) *mecA* geni pozitif bulunmuş, oksasilin direnci ile *mecA* geni varlığı arasındaki ilişkinin *S. aureus*'larda %100, KNS'larda ise %95.7 düzeyinde olduğu gözlenmiştir. Kocagöz ve Ünal¹⁶, 1776 klinik izolattan rastgele seçtikleri 178 metisiline dirençli stafilokok ile yaptıkları çalışmada, incelenen izolatların %94'ünde *mecA* genini saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca stafilokoklarda oksasilin direncinde farklı mekanizmaların rolü olabildiğini ve bu nedenle *mecA* geni bulunmayan oksasilin dirençli stafilokok izolatlarının diğer direnç mekanizmaları yönünden test edilerek değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir¹⁶.

Çalışmada, AME genlerinden *aac(6'')/aph(2'')* 22 (%44.9), *ant(4)-la* 7 (%14.3) ve *aph(3')-IIIa* 2 (%4.1) izolatta pozitif olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre en sık karşılaşılan AME geni *aac(6'')/aph(2'')* olurken bunu *ant(4)-la* ve *aph(3')-IIIa* izlemiştir. Choi ve arkadaşları¹¹'nin yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Schmitz ve arkadaşları¹³ Avrupa'da 19 hastaneden elde edilen stafilokok izolatlarıyla yapmış oldukları çalışma sonucunda, en sık (%68) karşılaşılan AME geninin bifonksiyonel enzimi kodlayan *aac(6'')/aph(2'')* geni olduğunu, bunu sırasıyla *ant(4)-la* (%48) ve *aph(3')-IIIa* (%14) geninin izlediğini bildirmişlerdir. Bununla beraber, Ida ve arkadaşları¹²'nin Japonya'da yaptıkları çalışmada, *ant(4)-la* geninin prevalansı (%84.5) diğer iki genden (*aac(6'')/aph(2'')* için %61.7, *aph(3')-IIIa* için %8.9) daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar dikkate alındığında, uygulanan antibiyotik politikasına bağlı olarak kıta, ülke ve hatta bölgeler arasında AME genlerinin prevalansında farklılıkların gözlenebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma süreci içerisinde, Türkiye'de metisilin ve aminoglikozid direnç genlerinin multipleks PCR ile araştırılması ile ilgili yayınlanmış mevcut bir veriye ulaşılammıştır. Bu durumda çalışmamızın, metisilin ve aminoglikozid direnç genlerinin araştırılmasına yönelik ülkemizdeki ilk çalışmalardan biri olduğunu düşünmekteyiz. İleride daha geniş kapsamlı ve daha fazla sayıda izolat ile yapacağımız çalışmalara prototip olacağını düşündüğümüz bu çalışmada, benzer çalışmalar yapacak olan diğer araştırmacılara yardımcı olabileceğine inandığımız teknikler karşılaştırılmış ve elde edilen veriler yorumlanmıştır. Tüm dünyada metisiline dirençli stafilokokların prevalansında belirgin artışlar görülmektedir. Metisiline dirençli suşlarda aminoglikozidlere ve diğer antibiyotiklere karşı çoklu direnç varlığının, multipleks PCR ve diğer moleküler tekniklerin

kullanılabildiği genotipik yöntemlerle ortaya konulabilmesi epidemiyolojik açıdan da büyük önem arz etmektedir. Bu tekniklere özellikle hastane ortamında enfeksiyonların hızlı tanısı ile tedavinin doğru ve erkenden belirlenebilmesi amacıyla gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Chambers HF: The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001, 7: 178-182.
2. Witte W: Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: Epidemiological aspects. J Clin Microbiol 1999, 44: 1-9.
3. Gradelski E, Valera L, Aleksunes L, Bonner D, Tomc J: Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. J Clin Microbiol 2001, 39: 2961-2963.
4. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001, 39: 3946-3951.
5. Martineau F, Picard FOJ, Lansac N, et al: Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 2000, 44: 231-238.
6. Fluit ADC, Visser MR, Schmitz F: Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001, 14: 836-871.
7. Dickgiesser N, Kreiswirth BN: Determination of aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* by DNA hybridization. Antimicrob Agents Chemother 1986, 29: 930-932.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları. 2002, M100-S12, 12. bilgi eki, 22(1), Pennsylvania, USA (Türkçe çevirisinden).
9. Nunes ELC, Santos KRN, Mondino PJJ, Bastos MCF, Marval MC: Detection of *ileS*-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. Diag Microbiol Infect Dis 1999, 34: 77-81.
10. Sambrook J, Russell W: Phenol-chloroform extraction of nucleic acids. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2002, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
11. Choi SM, Kim S, Kim C, et al: Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. J Korean Med Sci 2003, 18: 631-636.
12. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W: Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003, 41: 4089-4094.
13. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M: Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Clin Microbiol 2001, 39: 3115-3121.
14. Schmitz F, Fluit AC, Gondolf M, et al: The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. J Clin Microbiol 1999, 43: 253-259.
15. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH: Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. BioTechniques 1997, 23: 504-511.
16. Kocagoz S, Unal S: The practical use of PCR for rapid detection of methicillin resistance among *Staphylococcal* clinical isolates from Turkish hospitals. J Clin Microbiol 1997, 35: 2188-2189.