

STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN VE ENTEROKOKLARDA VANKOMİSİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Serhat ÜNAL

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, ANKARA
sunal@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Antibakteriyel direncin doğru belirlenmesi etkin infeksiyon kontrol çalışmalarında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının önemli bir sorumluluğudur. Bu amaçla günümüzde halen temel olarak kullanılan konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra otomatize sistemlerin ve başka yöntemlerin de kullanılması gerekli olmaktadır. Bu ihtiyaç çoklu dirençli bakterilerin yaygın olduğu merkezlerde daha da belirgindir. Bu amaçla yapılan kültür ve ardından fenotipik duyarlılık testleri halen pek çok laboratuvarında uygulanan temel yaklaşımdır. Ancak fenotipik testlerin sonuçlandırılması bakterinin kültürde üretilmesinden sonra 24-28 saat kadar bir süreyi gerektirmektedir. Bu nedenle son 20 yılda immunolojik veya moleküler tekniklere dayalı hazırlanmış hızlı duyarlılık testleri büyük önem kazanmıştır. Stafilocoklarda *mecA* veya enterokoklarda *vanA* belirlenmesi gibi güvenilir testlerden elde edilecek pozitif sonuçlar hastalara daha erken dönemde uygun antibiyotik tedavisinin başlanmasını sağladığı gibi, olası salgınlarmın erken dönemde tespitine ve hastaların uygun şartlarda izolasyonuna imkan tanımaktadır.

Anahtar sözcükler: antibakteriyel direnç, enterokok, stafilocok

SUMMARY

Detection of Methicillin Resistance in Staphylococci and Vancomycin Resistance in Enterococci

Effective infection control efforts obviously depend on the performance of the laboratory to detect the emerging resistant pathogens accurately and confirm the resistance patterns by additional methods to conventional or automated systems. Conventional methods still remain the predominant approaches for detection and identification of bacteria and resistance patterns. However, the estimated time for conventional tests to detect resistance is minimum 24-48 hours for MRSA, VRE and/or other epidemiologically important pathogens. Most of the tests used for rapid detection require bacterial growth in culture. Rapid methods based on immunologic or molecular technologies have contributed to our ability significantly. Molecular assays for several resistance markers are reliable such as *mecA* in staphylococci and *vanA* in enterococci. A positive result from any of these tests may allow more rapid institution of appropriate isolation precautions and/or early investigation of potential outbreaks besides is often crucial for the optimal therapy of infected patients.

Keywords: antibacterial resistance, enterococci, staphylococci

Staphylococcus aureus'da metisilin direncinin saptanması amacıyla kullanılan testler

Konvansiyonel kültür yöntemleriyle *S.aureus*'un tanımlanması güç olmamasına rağmen; metisilin direncinin belirlenmesi inokulum miktarı, inkübasyon zamanı, besiyerinin pH'sı ve tuz konsantrasyonu gibi pek çok faktörden etkilenen, zaman gerektiren bir yöntemdir.

Metisilin direnci *mecA* geni varlığında beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük afinitesi olan alternatif bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) sentezi sonucu oluşur. *MecA* geninin saptanması metisilin direncinin saptanmasında

altın standarttır ve referans laboratuvarlarda uygulanması beklenmektedir. *MecA* geninin tespiti için lateks aglutinasyon testleri (LA) ve nükleik asit çoğaltma temeline dayalı testler geliştirilmiştir. LA testleri PBP2a'nın lateks ile kaplı monoklonal antikorlar ile reaksiyon vermesine dayanır. Soloaga ve ark.⁽²⁶⁾'nın 79 *mecA* pozitif, 21 *mecA* negatif *S.aureus* izolatını disk difüzyon, agar dilüsyon, oksasilin agar tarama testi ve metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA)-Screen Latex (Denka Seiken, Niigata, Japan) ile test ettikleri bir çalışmada bütün testlerin duyarlılığı % 95-100 arasında bulunmuştur. Ancak LA tes-

tinin sonucu 15 dakika içerisinde verebilmesi önemli bir avantaj olarak değerlendirilmiştir. Doksan dokuz MRSA ve metisilin duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşu ile yapılan bir başka çalışmada ise testin duyarlılığı % 100, özgünlüğü ise % 97 bulunmuştur⁽³⁾.

Koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) ise *mecA* geninin heterojen olarak sentezlenmesi fenotipik testlerle metisilin direncinin gösterilmesini zorlaştırmaktadır. MRSA suşlarının tanımlanmasında başarılı sonuçlar veren MRSA-Screen Latex testi KNS için kullanıldığında *Staphylococcus epidermidis* ile başarılı sonuçlar vermiş, ancak *Staphylococcus wagneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lugdunensis* ve *Staphylococcus hominis* suşlarında yanlış pozitif sonuçlar elde edilmiştir^(7,8,30). Yüksek inokulum kullanılması testin özellikle KNS'lar için özgünlüğünü ve duyarlılığını artırmaktadır⁽⁴⁾. LA testinin rutin olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımının yararlanımını araştıran bir çalışmada; Gram pozitif üreme saptanan 25 kan kültürünün alt kültürleri yapılmış ve plakta üreme görünür hale gelir gelmez LA testi (OLA; Oxoid, Baginstoke, England) uygulanmıştır. OLA sonuçları oksasilin MİK sonuçları ile % 100 korelasyon göstermiş; LA testi ile ortalama 19.4 saat erken sonuç alınmıştır. Bu sonuçlarla 25 hastadan 15'inin tedavileri değiştirilmiştir⁽¹⁷⁾.

Küme halinde Gram pozitif kok üremesi saptanan 200 kan kültürünün ticari bir gen prob hibridizasyon cihazı ile (EVIGENE MRSA Detection Kit; Statens Serum Institut) test edildiği bir çalışmada, PZR ve kültür ile saptanan tüm MRSA izolatları doğru tanımlanmıştır. Bu cihaz ile stafilokoklara spesifik 16S rRNA, *mecA* ve *nuc* genleri saptanarak metisilin direnci yanısıra KNS ayırımı da tanımlanmıştır⁽¹⁵⁾. Bir başka ticari kimerik prob esasına dayalı cihaz olan Velogene Rapid MRSA Identification Assay (ID Biomedical Corp., Vancouver, British Columbia, Canada) yine MRSA tanımlaması için kullanılan lateks aglutinasyon, BBL Crystal MRSA ID System (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) ve PZR yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Testlerin duyarlılığı ve özgünlüğü Velogene için % 98.5 - % 100, LA için % 98.5 - % 100 ve BBL Crystal MRSA ID içinse % 98.5 - % 98 olarak bulunmuş-

tur. Velogene özellikle PZR ile *mecA* geninin saptanmasının mümkün olmadığı durumlarda uygun bir alternatif olabilmektedir⁽¹⁶⁾. Gen prob hibridizasyon yöntemleri PZR ile ilişkili geri değerlendirme olmaksızın MRSA tanımlamasını yapabilmektedir.

Geçtiğimiz 10 yılda MRSA tanımlaması için PZR esasına dayalı pek çok cihaz geliştirilmiştir. Murakami ve ark.⁽¹⁸⁾ *S.aureus* için; Predari ve ark.⁽²²⁾ ise KNS'lar için başarılı çalışmalar yapmışlardır. Tek primer kullanan bu PZR yöntemleri, uygulanması kolay olmasına rağmen inhibisyona karşı dayanıksızdır. Tüm izolatlarda bulunan bir geni çoğaltmak üzere eklenecek ikinci bir primer seti bu sorunu çözebilmiştir. *Nuc* ve *mecA* genlerini amplifiye eden bir multipleks PZR yöntemiyle 135 *S.aureus* ve 84 KNS test edilmiş; *nuc* spesifik sekansların amplifikasyonu ile tür düzeyinde yapılan tanımlama ile tamamen uyumlu bulunmuştur⁽²²⁾. Bir başka çalışmada *coa*-spesifik PZR ile konvansiyonel lam aglutinasyon testi sonuçlarının birbiriyle % 100 uyumlu olduğu gösterilmiştir⁽¹⁾. 16S rRNA'nın bir parçasının MRSA için internal kontrol olarak kullanıldığı çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır^(6,10). Zambardi ve ark.⁽²⁹⁾ 468 *S.aureus* izolatını *gyr* genini internal kontrol olarak kullanarak metisilin direnci için test etmiş; aşırı düzeyde beta-laktamaz salgılayan suşlar dışında MİK değerleri ile uyumlu sonuçlar elde etmiştir. Towner ve ark.⁽²⁷⁾'nin geliştirdiği *mecA* ve *femB* genlerinin çoğaltılmasına dayalı multipleks PZR yöntemiyle test edilen 152 *S.aureus* izolatında 40'ı MİK testleri ile metisilin dirençli olarak tanımlanmış; fakat bunlardan sadece 24'ünün *mecA* genine sahip olduğu gösterilmiştir. Yanısıra MİK yöntemiyle metisiline hassas olarak değerlendirilen suşların ikisi *mecA* pozitif bulunmuştur. Ünal ve ark.⁽²⁸⁾ internal kontrol olarak *S.aureus*'ta peptidoglikan sentezinde görev yapan *femA* genini kullanmış; test edilen 79 *S.aureus* izolatı için PZR ve fenotipik testler arasında uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Yine bu grup tarafından aynı primer seti kullanılarak ülkemizde izole edilen suşlarda da PZR yöntemi ile metisilin direnci tespiti çalışmaları yapılmıştır⁽¹²⁾.

Çoklu ilaç direnci nedeniyle MRSA infek-

siyonlarının tedavisinde güçlük yaşanmaktadır. Mupirosin özellikle MRSA taşıyıcıları için uygun bir tedavi alternatifi olabilmektedir. Zhang ve ark.⁽³¹⁾ 16S rRNA, *nuc*, *mecA*, *mupA* (mupirosin direncinde rol oynayan gen) genlerini hedefleyen kuadripleks PZR yönteminde aynı anda *S.aureus*, KNS ayırımını ve metisilin, mupirosin direncini belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışmaya 99 ATCC ve 323 daha önce tanımlanmış klinik izolat dahil edilmiştir. Yöntemin özgünlüğü ve duyarlılığı % 100 bulunmuştur.

PZR yöntemi ile klinik materyalden doğrudan MRSA varlığını tanımlamaya yönelik ilk çalışma Kitagawa ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından yapılmıştır. Çalışmaya major cerrahi sonrası yüksek ateş ve diyare gelişen 35 hasta ve altı sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Kan kültüründen yapılan PZR ile *mecA* geni saptanan 12 hastanın kan kültürlerinde de MRSA izole edilmiştir. Diğer hastalar ve sağlıklı gönüllülerin hiçbirinde kan kültürü veya PZR pozitifliği saptanmamıştır. PZR sonuçları dört saat içerisinde, kültür sonuçları 48 saatte alınmıştır.

Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle klasik PZR yöntemine göre daha hızlı ve daha az kontaminasyon riski taşıyarak direnç geni belirlenebilmektedir. Shrestha ve ark.⁽²⁵⁾ MRSA'nın kan kültürlerinden LightCycler sistemi (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ile belirlenmesi için yaptıkları çalışmada *mecA* ve *sa442* genlerini hedeflemiştir. Üreme sinyali veren ve yapılan boyamada küme yapan Gram pozitif kok görülen kan kültürleri hem konvansiyonel kültür yöntemiyle hem de LightCycler sistemi ile test edilmiştir. LightCycler sisteminin MRSA için özgünlüğü ve duyarlılığı % 100'iken; KNS'larda duyarlılık % 77.4, özgünlük ise % 92.3 olarak bulunmuştur. Bu yöntem klinisyenin *S.aureus* bakteriyemisini ve metisilin direncini 24-36 saat daha erken öğrenmesini sağlamıştır.

bdNA sinyal amplifikasyon sistemi ise örnek hazırlama aşamasında özellik gerektirmeyen ve PZR yöntemindeki en önemli sorunlardan biri olan inhibitörlerden etkilenmeyen bir yöntemdir. Bu yöntem 416 klinik izolattan *mecA* geninin varlığını araştırmak için test edildiğinde PZR ile % 100 uyumlu sonuç alınmıştır⁽²⁵⁾.

Sonuçlar 6 saat içerisinde alınabilmektedir.

CytAMP (Cytocell Ltd., Adderbury, Oxford, United Kingdom) cihazının MRSA RNA'sını izotermal sinyal esasına dayalı olarak amplifiye ettiği belirtilmektedir. Hedef genler *coa* ve *mecA*'dır. Bu şekilde aynı anda hem *S.aureus* tanımlamasını yapabilmekte hem de metisilin direncini saptamaktadır. Levi ve ark.⁽¹⁴⁾ CytAMP sistemini tarama için alınan sürüntü örneklerinde denemişlerdir. CytAMP cihazı ve *mecA-femB* PZR sisteminin her ikisi de 396 klinik materyalden 113 MRSA izolatını tanımlarken, konvansiyonel kültür metodu 109 MRSA izolatını tanımlayabilmiştir. Konvansiyonel kültür ve CytAMP yöntemlerinin duyarlılık ve özgünlükleri birbirine benzer olmakla birlikte; CytAMP yöntemi klinik örneklerin zenginleştirilmiş sıvı besiyerinde bir gecelik inkübasyonu sonrası uygulanması ile ertesi gün sabahdan kliniğe sonuçların rapor edilmesine imkan vermiştir⁽¹³⁾.

Enterokoklarda vankomisin direncinin saptanması amacıyla kullanılan testler

Enterokoklar önemi giderek artan nozokomial enfeksiyon etkeni bakterilerdir. Hastane ortamında çevre yüzeylerinden, hastane personelinin ellerinden ve kullanılan cihazlardan izole edilmektedirler. Beta-laktamlar, aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol ve linkozamidlere karşı intrinsek dirence sahip olmaları glikopeptidleri tedavi için önemli bir seçenek haline getirmiştir. Ancak enterokokların bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi çok uzun zaman almamıştır. *VanA* geninin varlığında D-Ala-D-Ala ligaz üretimi ile peptidoglikan yan zincirleri glikopeptidler için düşük afiniteye sahip olan D-alanil-D-laktat şeklinde ifade edilmektedir. *VanA* fenotipi en sık görülen fenotiptir ve yüksek düzeyde vankomisin ve teikoplanin direncine neden olmaktadır. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* ve *Enterococcus durans*'ta gösterilmiştir. *VanB* fenotipi ise vankomisine karşı dirence neden olurken in-vitro olarak teikoplanine duyarlıdır. *VanA* ve *vanB* tiplerinin temel özelliği indüklenebilir olmaları ve plazmid aracılığıyla transfer edilebilmeleridir. *VanC*, *Enterococcus gallinarum* ve

Enterococcus casseliflavus için yapısaldır. *VanD*, *E.faecium*, *vanE* ise *E.faecalis* için yapısaldır⁽²⁾.

Günümüzde pek çok hastanenin VRE için sürveyans programları mevcuttur. Genelde kültüre dayalı metodlar kullanılmakta; bunların sonuçlandırılması zaman almaktadır. VRE tespiti için ilk moleküler yöntem Dutka-Malen ve ark.⁽⁵⁾ tarafından tanımlanmış, multipleks PZR ile *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* ve *vanC3*'ü saptamak üzere primer setleri geliştirilmiştir. Satake ve ark.⁽²⁴⁾ perirektal veya rektal sürüntü örneklerini PZR ile test etmiştir. Seksen yedi örneğin kültüründe VRE saptanmış; bunların 59'u multipleks PZR ile, 77'si ise tek primerin kullanıldığı PZR ile *vanA* pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada PZR duyarlılığı (% 88.5) düşük bulunmuştur. Aynı primerlerin bir miktar değiştirilmiş şekli ile yapılan çalışmalarda ise daha iyi sonuçlar elde edilmiş; fakat duyarlılık hiçbir zaman % 100'e ulaşmamıştır^(21,23).

Patel ve ark.⁽²⁰⁾ farklı primer setleri ile PZR ürünlerinin restriksiyon enzim analizlerini yaptıkları çalışmada 100 klinik izolatu test etmiştir. İzolatlardan 10'unun *vanA*, 30'unun *vanB*, 12'sinin *vanC1*, 6'sının *vanC2* ve 1'inin hem *vanA* hem de *vanC1* taşıdıkları gösterilmiştir. Jayaratne ve Rutherford⁽⁹⁾ PZR ile konvansiyonel kültür yöntemini karşılaştırmış ve ayda ortalama 1200 VRE sürveyans kültürü yapan bir laboratuvar için maliyet etkinliğini araştırmıştır. Litrede 6 mg vankomisin içeren safra eskülin ağarda üreme saptanan 657 klinik örnek multipleks PZR ile de *vanA* ve *vanB* genleri açısından pozitif bulunmuştur. PZR'in duyarlılığı % 95.4, özgünlüğü ise % 99.8 bulunmuştur. PZR'in ortalama maliyeti test başına 8.26 Kanada Doları'ya yakın maliyet 9.45 Kanada Doları olmuştur. PZR ile sonuç ortalama 48 saat ile alınırken kültür ile sonuç 96 saatte alınabilmiştir. Bu sonuçlar; özellikle sürveyans kültürleriyle yoğun bir şekilde uğraşan laboratuvarlar için PZR yönteminin maliyet-etkinlik açısından daha uygun olacağını düşündürmektedir.

Gerçek zamanlı PZR, VRE saptanması için klasik PZR yöntemlerinden ve kültür metodundan çok daha hızlı saptama şansını sunmaktadır. Palladino ve ark.⁽¹⁹⁾ LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)

ile konvansiyonel kültürü VRE saptanması amacıyla karşılaştırmış; kullanılan zenginleştirme besiyerinden direk PZR yapılması besiyerinden yapılan fenotipik tanımlama testlerine göre daha duyarlı bulunmuştur. Doğrudan rektal sürüntü örneklerinden PZR yapıldığında ise sonuçlar çok hızlı elde edilmesine rağmen yöntemin duyarlılığı kültüre göre düşük kalmıştır.

Yüksek düzey aminoglikozid direnci ise enterokoklardaki bir diğer önemli direnç sorunudur. Moleküler yöntemlerin kullanılarak direncin saptanması bazı epidemiyolojik çalışmalara konu olmuş; başarılı sonuçlar alınmasına rağmen direnç genlerinin fazlalığı bu konudaki en önemli kısıtlayıcı faktör olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Brakstad OG, Maeland JA, Tveten Y: Multiplex polymerase chain reaction for detection of genes for *Staphylococcus aureus* thermonuclease and methicillin resistance and correlation with oxacillin resistance, *APMIS* 1993;101(9):681-8.
2. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG: Vancomycin-resistant enterococci, *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4):686-707.
3. Chediak-Tannoury R, Araj GF: Rapid MRSA detection by a latex kit, *Clin Lab Sci* 2003;16(4):198-202.
4. Corso A, Soloaga R, Faccone D, Galletti P, Corbella S, Iglesias M, Galas M: Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50(3):223-5.
5. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *J Clin Microbiol* 1995;33(1):24-7.
6. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH: Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory, *J Clin Microbiol* 1994;32(7):1768-72.
7. Horstkotte MA, Knobloch JK, Rohde H, Mack D: Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test, *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3700-2.
8. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, El Sayed S, Lannigan R: Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol* 2000;38(2):752-4.
9. Jayaratne P, Rutherford C: Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR, *J Clin Microbiol* 1999;37(6):2090-2.

10. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M: Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR, *J Hosp Infect* 1999;43(1):33-7.
11. Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Endo M, Ishibiki K, Kobayashi Y, Arai T, Kitajima M: Rapid diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia by nested polymerase chain reaction, *Ann Surg* 1996;224(5):665-71.
12. 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(8):2188-9.
13. Kolbert CP, Arruda J, Varga-Delmore P, Zheng X, Lewis M, Kolberg J, Persing DH: Branched-DNA assay for the detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci, *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2640-4.
14. Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ: Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient-screening swabs, *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3187-91.
15. Levi K, Towner KJ: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood with the EVI-GENE MRSA detection kit, *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3890-2.
16. Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE: Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 2000;38(6):2170-3.
17. Marlowe EM, Linscott AJ, Kanatani M, Bruckner DA: Practical therapeutic application of the oxidid PBP2' latex agglutination test for the rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in blood cultures, *Am J Clin Pathol* 2002;118(2):287-91.
18. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S: Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 1991;29(10):2240-4.
19. Palladino S, Kay ID, Flexman JP, Boehm I, Costa AM, Lambert EJ, Christiansen KJ: Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay, *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2483-6.
20. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR 3rd: Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC2/3* genes in enterococci, *J Clin Microbiol* 1997;35(3):703-7.
21. Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, Chernesky MA, Mahony JB: Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin-resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR, *Mol Cell Probes* 1999;13(4):275-81.
22. Predari SC, Ligozzi M, Fontana R: Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction, *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(12):2568-73.
23. Roger M, Faucher MC, Forest P, Antoine P, Coutlee F: Evaluation of a *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak, *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3348-9.
24. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC: Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR, *J Clin Microbiol* 1997;35(9):2325-30.
25. Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Isada CM, Procop GW: Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system, *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2659-61.
26. Soloaga R, Corso A, Galletti P, Faccone D, Galas M, Grupo Colaborador MRSA: Methicillin resistance detection in *Staphylococcus aureus*: Comparison between conventional methods and MRSA-Screen latex agglutination technique, *Rev Argent Microbiol* 2004;36(1):36-40.
27. Towner KJ, Talbot DCS, Curran R, Webster CA, Humphreys H: Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Med Microbiol* 1998;47(7):607-13.
28. Unal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CY, Preston D, Skatrud PL: Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol* 1992;30(7):1685-91.
29. Zambardi G, Reverdy ME, Bland S, Bes M, Feney J, Fleurette J: Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a multiplex-polymerase chain reaction assay, *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;19(1):25-31.
30. Zbinden R, Ritzler M, Ritzler E, Berger-Bachi B: Detection of penicillin-binding protein 2a by rapid slide latex agglutination test in coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol* 2001;39(1):412.
31. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM: New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci, *J Clin Microbiol* 2004;42(11):4947-55.