

DİRENÇ GELİŞİMİNİ ÖNLEMEDE MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİNİN KATKISI

Rıza DURMAZ

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA
rdurmaz@inonu.edu.tr

ÖZET

Antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle birlikte, direnç artmaya başlamış ve infeksiyon hastalıklarının tedavisi daha problemli hale gelmiştir. Direncin hızlı ve doğru olarak saptanması, direnç gelişimi ve yayılmasının önlenmesinde kritik öneme sahiptir. Birçok bakteride direncin saptanmasında fenotipik yöntemler kullanılmakla birlikte, yavaş üreyen bakterilerde olduğu gibi bazı spesifik mikroorganizmalarda fenotipik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu mikroorganizmalardaki direncin saptanması ve takibinde kullanılacak hızlı ve doğru sonuçlar verebilen moleküler metotlar bulunmaktadır. Moleküler yöntemler, direncin saptanması ve tanımlanması yanında, dirençli klonların yayılmasının takibinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylece direncin gelişimi ve yayılmasının durdurulmasına yardımcı olmaktadır.

Anahtar sözcükler: ilaç direnci, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, moleküler yöntemler, *Mycobacterium tuberculosis*, vankomisine dirençli enterokoklar

SUMMARY

Effect of Molecular Microbiology to Prevent Development of Drug Resistance

In parallel to use of antibiotics, drug resistance has begun to increase and treatment of the infectious diseases becomes more problematic. Rapid and accurate determination of the drug resistance is very critical to prevent drug resistance and control the resistant strains. Although phenotypic methods have been performed to determine drug resistance in many microorganisms, these methods are failing to determine resistance in some specific microorganism such as slow growing bacteria. There are many molecular methods which are rapid and accurate for determination of drug resistance and performing active surveillance for these microorganisms in a variety of healthcare populations. In addition to detection and identification of drug resistance, molecular methods are widely used to follow spreading ways of the drug resistant clones. By this way these methods help to stop both development and distribution of drug resistance.

Keywords: drug resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, molecular methods, *Mycobacterium tuberculosis*, vancomycin resistant enterococci

Antibiyotiklerin infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanıma girmesiyle birlikte dirençli suşlarda artış olmuş, bunun sonucu olarak tedavide zorluklar kaçınılmaz hale gelmiştir. Direncin ortaya çıkmasında hatalı antibiyotik kullanımları kadar, laboratuvar yöntemlerindeki yetersizlikler de önemli rol oynamaktadır. Direncin belirlenmesinde geç kalınması veya doğru olarak ortaya konulamaması durumunda, dirençli suşlara bağlı infeksiyonların tedavisi ve kontrolü sorun haline gelmektedir. Sorunların üzerinden gelinmesinde direncin mekanizması ve yayılma yollarının belirlenme-

sinin büyük önemi vardır. Bu noktada moleküler yöntemlerin büyük katkıları olmaktadır. Moleküler yöntemlerin direncin önlenmesindeki etkinliği iki ana başlık altında incelenebilir. 1) Direncin kısa sürede ve doğru olarak belirlenmesi. 2) Direncin yayılmasının önlenmesi.

1) Direncin kısa sürede ve doğru olarak belirlenmesi

İlaç direncinin saptanmasındaki gecikme infeksiyonların mortalite, morbidite ve bulaşı üzerine oldukça önemli etkilere sahiptir. Klinik önemi olan bakterilerin büyük bir kısmında

direnç, fenotipik yöntemlerle saptanabilmektedir. Ancak, fenotipik yöntemlerle direnç saptanması bazı mikroorganizmalarda geç sonuç vermekte, bazılarında ise var olan direnç fenotipik yöntemlerle doğru olarak ortaya konulamamaktadır. Moleküler yöntemlerle direnç belirleme çalışmaları, fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığı mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Başta *Plasmodium falciparum* ve *Plasmodium vivax* olmak üzere parazitler, virüsler (hepatit B virüsü, Human immunodeficiency virus, Influenza tip A gibi) ve bakterilerde direncin belirlenmesinde moleküler yöntemlerle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Bu yazıda, üzerinde fazlaca araştırmalar yapılarak klinik yararları ortaya konulmuş olan, bakterilerle ilgili çalışmalara yer verilecektir.

Bakterilerle ilgili direnç belirleme çalışmalarının başında, *Mycobacterium tuberculosis* suşlarındaki izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) direncini belirlemeye yönelik uygulamalar gelmektedir. Tüberküloz basillerinde ilaç direncini belirlemede kullanılan standart proporsiyon yöntemi, otomatize kültür sistemleri kullanıldığında bile, kültürde basil üretildikten sonra 7-12 gün içerisinde sonuç verebilmektedir^(13,17). Gecikme süresi özellikle çoğul ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın ilaç dirençli (extremly drug resistance, XDR) *M.tuberculosis* suşlarının yayılması açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır. Bu aşamada moleküler yöntemler önemli katkı sağlamaktadır. *M.tuberculosis* suşlarındaki ilaç direncini saptamak amacıyla katı faz hibridizasyon testleri (INNO-LiPA RIF TB, GenoType MTBDR, microarray), DNA dizi analizi, polymerase chain reaction single-strand confirmation polymorphism analysis (PCR-SSCP), heterodupleks analizi, pyrosequencing, mutasyona özgü primer ile amplifikasyon, gerçek zamanlı polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu ve amplifikasyon ürününün mutasyona özgü restriksiyon enzimle analizi gibi çok sayıda moleküler teknik kullanılmaktadır. Bu yöntemler, kültürde üretilmiş olan basiller yanında, doğrudan mikroskopisi pozitif klinik örneklerle de uygulanabilmektedir. Mikroskopisi pozitif olan örneklerle uygulandıklarında örneklerin % 97'sinde 1-2 gün içerisinde sonuç alınabilmekte; rifampisin ve izoniazid dirençli suşlar, sırasıyla % 96-99 ve

% 84-94 oranlarında doğru olarak saptanabilmekte; yöntemlerin özgüllüğü ise % 99'un üzerinde bulunmaktadır^(1,21). Moleküler yöntemlerin RIF ve INH direncini belirlemede fenotipik yöntemlerle uyum oranları % 90 ve üzerinde olmaktadır^(5,15). Kültüründe *M.tuberculosis* üretilmiş klinik örneklerde LiPA testinin RIF dirençli suşları saptamadaki duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 99.6, pozitif prediktif değeri % 93, negatif prediktif değeri % 99.7 ve sonuçların klasik yöntemlerle uyumu % 99 olarak bildirilmiştir⁽⁷⁾. DNA microarray yöntemiyle RIF dirençli suşların % 95'i, INH dirençli suşların % 80'den fazlası 12 saat içinde saptanabilmekte; ayrıca bu yöntemle klinik örnekten bakterinin saptanması, tür tayini ve virülans geninin aynı anda belirlenmesi de mümkün olabilmektedir⁽¹⁰⁾. Geleneksel yöntemlerde kültür ve duyarlılık testleri için gerekli olan süre, moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla önemli ölçüde kısalmaktadır. Yapılan bir araştırmada; mikroskopisi pozitif olan bütün klinik örneklerde *rpoB* genindeki mutasyonların saptanmasına yönelik moleküler testler kullanıldığında; ÇİD suşlarının saptanma süresi ortalama 6 hafta azalmış, kültür ve duyarlılık testlerine göre uygun tedaviye başlama süresi ortalama 51 gün daha erken olmuştur⁽¹⁶⁾. Fenotipik ve moleküler yöntemler arasında saptanan yüksek orandaki uyum, bu yöntemlerin, uygun tüberküloz tedavisine kısa sürede başlanması için yararlı olacağını göstermektedir.

Staphylococcus aureus'larda metisilin direncini saptamada "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI)'nin önerdiği sefoksitin disk difüzyon testi yanında Vitek 2 sefoksitin tarama ve Vitek 2 oksasilin duyarlılık testi gibi fenotipik yöntemler olmakla birlikte; dirençten sorumlu *mecA* geninin moleküler yöntemlerle araştırılması referans yöntem olarak kabul edilmektedir⁽²⁾. Metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) taşıyıcılarının kısa sürede saptanarak, gerekli önlemlerin biran önce alınması, dirençli suşlara bağlı infeksiyonların yayılmasının engellenmesi bakımından önemlidir. Moleküler yöntemlerle 1-2 saat içerisinde metisilin direnci yanında, stafilokok türleri arasından *S.aureus* ayrımı da yapılabilmektedir⁽²⁰⁾. Taşıyıcılarda MRSA taramak için geliştirilmiş olan ticari bir moleküler test ile yapılan kapsamlı çalışmada;

özgüllük ve duyarlılık sırasıyla % 95 ve % 85 olarak saptanmış ve yöntemin sağlık merkezlerindeki MRSA aktif sürveyansı için hızlı, basit ve güvenilir olduğu ortaya konulmuştur⁽²⁷⁾.

Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda ciddi infeksiyonlara yol açmaktadırlar. Enterokoklarda altı tip kazanılmış direnç tanımlanmıştır. Bunlardan yalnızca *vanA* ve daha az olarak *vanB* dominat olup, diğerleri nadirdir. *VanA* ve *vanB* genlerini bulduran suşlar yüksek düzeyde vankomisine direnç gösterirken, *vanC* genini bulduranlarda (*Enterococcus gallinarum* ve *E.casseliflavus*) düşük düzeyde direnç gözlenmektedir. Plazmit veya transpozonlar üzerinde bulunan vankomisin direncinden sorumlu genler, enterokoklar ve diğer bakteriler arasında lateral veya vertikal yolla transfer edilerek hızla yayılabilmektedir⁽²⁶⁾. Rutin yöntemlerle VRE saptanması 4-5 gün gibi uzun zaman almakta, bu süre içerisinde taşıyıcılar dirençli suşları yeni bireylere ve çevreye bulaştırmaya devam etmektedirler. Gecikmenin giderilmesinde moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Yapılan bir araştırmada mültepleks polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi kullanılarak, 30-48 saat içerisinde *vanA* ve *vanB* taşıyan VRE suşlarının saptanması mümkün olabilmüş; mültepleks-PZR yöntemiyle VRE taranmasının ve her yeni izole edilen suşların moleküler yöntemlerle tiplendirilmesinin hastanelerdeki VRE kontrol programına eklenmesinin önemi vurgulanmıştır⁽¹⁸⁾. Moleküler yöntemler klinik örneklerde VRE taranmasında süreyi kısaltmakla birlikte özgüllük ve duyarlılık düşüktür^(4,26). Enterokoklarda tedavinin yönlendirilmesi bakımından vankomisin direnç tipinin belirlenmesi önemlidir. *VanA* pozitif suşlarda vankomisin yanında teikoplanine de direnç gözlenirken; *vanB* taşıyan suşlar teikoplanine duyarlıdırlar ve bu suşlara bağlı infeksiyonların tedavisinde gentamisinle birlikte teikoplanin kullanılabilir. Mültepleks PZR yöntemiyle vankomisin direnci, direncin tipi, makrolit ve aminoglikozitlerin etkinliği belirlenebilmektedir⁽³⁾.

Bunlara ilave olarak özellikle kritik klinik örneklerden üretilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarındaki orta ve yüksek düzey penisilin direncinin kısa sürede saptanmasında başarıları

sonuçlar veren (duralılık % 96) "seminested"-PZR⁽⁶⁾, Gram pozitif koklarda makrolit direncinin saptanmasında kullanılan mültepleks-PZR⁽⁸⁾, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlara direncin saptanmasında kullanılan mültepleks PZR ve dizi analiz yöntemleri⁽¹⁴⁾ gibi çalışmalar da bulunmaktadır.

2) Direncin yayılımının önlenmesi

Kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğuna karşı dirençten sorumlu genlerin, sıklıkla dışardan alınan mobil genetik elementlerle ilişkili oldukları bilinmektedir. Aktarılabılır ilaç direnci ilk olarak ellili yılların sonlarında saptanmıştır. O tarihten beri direnç genlerini taşıyan çok sayıda plazmit ve transpozon tanımlanmıştır. Plazmitlerin üzerinde çoğunlukla bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç genleri bulunmaktadır⁽²²⁾. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarındaki AmpC beta-laktamazlar plazmit üzerinde taşınmakta ve direncin yayılmasında plazmitin horizontal transferi önemli rol oynamaktadır^(11,12). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (örnek: blaTEM/CTX-M/SHV) konjugatif plazmitler üzerinde taşınmakta, konjugasyon ve integronlar aracılığı ile *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yayılabilmektedirler⁽²²⁾. TEM beta-laktamazlar ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae* arasında da transfer edilebilmektedir⁽¹¹⁾. Enterokoklardaki glikopeptid, aminoglikozit ve tetrasiklin direnci plazmit veya transpozon aracılı konjugasyonla yayılmaktadır⁽²²⁾. *E.faecalis*'deki konjugatif transpozon üzerinde bulunan *vanA* geninin, *S.aureus*'un bazı suşlarına transfer edilebildiği gösterilmiştir. Vankomisin dirençli *S.aureus* izolatlarının, üzerinde *vanA* direnç genini taşıyan Tn1546 transpozunu bulduran çoklu dirençli konjugatif plazmit içerdikleri bulunmuştur⁽²²⁾. Plazmitler üzerinde farklı direnç genlerinin kümeleşmiş olması, bakteriler arasında çoğul direncin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Direnç plazmitleri; konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyonla duyarlı olan alıcı bakterilere horizontal olarak aktarıldığında, onlarda da bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direncin oluşumuna yol açmaktadırlar⁽²⁴⁾.

Moleküler tiplendirme yöntemleriyle

çoğul ilaca dirençli *M.tuberculosis*, glikopeptidlere dirençli enterokoklar, MRSA, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşları, florokinolon dirençli *P.aeruginosa* ve *E.coli* suşları, karbapenem dirençli *P.aeruginosa* ve çoğul ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* gibi patojenlerin herhangi bir merkez, hastane, şehir, bölge veya ülke içinde veya ülkeler arasındaki yaygınlık derecesi, dirençli klonların yayılma yolları ve kaynağı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bunlara ilave olarak, bakterilerdeki direnç genlerinin horizontal veya vertikal yayılımı anlaşılabilir.

Temel olarak bakterilerdeki antibiyotik direnci iki yolla yayılmaktadır: a) Dirençli soyların klonal yayılmasıyla (vertikal yol), b) Direnç geninin bakteriler arasında aktarılmasıyla (horizontal)^(9,22). Bu durumu anlayabilmek için izolatlar arasında kromozomal ve dirençten sorumlu ekstrakromozomal genler yönünden ilişkiyi bakılır. Dirençli bakteriler klonal yonden ilişkili olmadıkları halde, ortak direnç geni bulunduyor ise direnç yayılımının horizontal; eğer her iki yöntemle ilişkili bulunuyor ise klonal yayılımla olduğu kabul edilir⁽²²⁾. Herhangi bir hastane veya toplumdaki dirençli suşların oranı yüksek, buna karşın dirençli suşlar arasındaki klonal ilişki düşük ise, direnç nedeni olarak, suşların klonal yayılması değil, direnç geninin horizontal aktarılması düşünülmelidir. Bu bilgiler, hastanelerde ve toplumda dirençli klonların yayılma derecesini anlamak ve kontrol altına almada yararlı olmaktadır⁽¹⁹⁾.

Dirençli klonların yayılımının önlenmesinde geleneksel infeksiyon kontrol önlemlerine ilave olarak moleküler tiplendirme yöntemlerinin uygulamaya girmesinin büyük katkıları olmuştur. Tayvan'da bir üniversite hastanesindeki MRSA infeksiyonlarının kaynağı ve kontrol önlemlerinin etkinliğini denetlemek amacıyla sağlık personeli ve hastalardan üretilen MRSA suşlarının "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE) ile tiplendirmesi yapılmış, iki predominant genotip saptanmış, taşıyıcıların topikal mupirosin ile tedavi edilmesiyle nozokomiyal MRSA infeksiyonlarında yarıdan daha fazla azalma kaydedilmiştir⁽²⁵⁾. Bir kulak burun boğaz servisinde 10 gün içinde ortaya çıkan ve yedi kişiyi etkileyen penisiline dirençli *Streptococcus*

pneumoniae (PRSP) salgını, PFGE yöntemiyle doğrulanmış ve uygulanan etkili kontrol önlemleriyle dirençli suşların yayılması kontrol altına alınabilmiştir⁽²³⁾.

Sonuç; moleküler yöntemler direncin saptanması ve yayılımının sınırlandırılması aşamalarında infeksiyon hastalıklarına büyük katkı sağlamaktadır. Günümüzde, tüberküloz basillerinde ÇİD direncinin erkenden saptanması ve dirençli klonların yayılma yollarının belirlenmesinde, moleküler yöntemlerin yararı kabul edilir hale gelmiştir. Diğer bakterilerdeki uygulamaların giderek yaygınlaşacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME: Rapid molecular screening for MDR TB in a high volume public health laboratory in South Africa, *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(7):787-92.
2. Batista N, Gutiérrez I, Lara M, Laich F, Méndez S: Evaluation of the cefoxitin 30 microgram disk diffusion method for detection of methicillin-resistance in selected *Staphylococcus aureus* isolates, *Rev Esp Quimioter* 2008;21(4):213-6.
3. Bozdoğan B: Gram pozitif koklarda direncin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin yeri, "Ağaçfidan A, Erturan Z (eds): XXXIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı s.443-6, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul (2008).
4. Chlebicki MP, Kurup A: Vancomycin-resistant *Enterococcus*: a review from a Singapore perspective, *Ann Acad Med Singapore* 2008;37(10):861-9.
5. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT: Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city, *J Clin Microbiol* 1997;35(5):1281-3.
6. Ding JJ, Su X, Guo FM, Shi Y, Shao HF, Meng XZ: Comparison of three different PCR-based methods to predict the penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from China, *Lett Appl Microbiol* 2009;48(1):105-11.
7. Drobniewski F, Rüscher-Gerdes S, Hoffner S: Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)-report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of

- Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), *Clin Microbiol Infect* 2007;13(12):1144-56.
8. Emameini M, Aligholi M, Aminshahi M: Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran, *Pol J Microbiol* 2008;57(2):173-8.
 9. Feil EJ, Enright MC: Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens, *Curr Opin Microbiol* 2004;7(3):308-13.
 10. Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S et al: Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin Microbiol Infect* 2005;11(7):531-9.
 11. Hawkey PM: Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes, *Br J Pharmacol* 2008;153(Suppl 1):S406-13.
 12. Li Y, Li Q, Du Y et al: Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-Type AmpC beta-lactamase resistance in China, *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1317-21.
 13. Martin A, Portaels F: Drug resistance and drug resistance detection, "Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds): *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care*" kitabında s.635-87, Bernd Sebastian Kamp and Patricia Bourciller, Beyenbur (2007).
 14. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE: Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and laCTX-M genes in Enterobacteriaceae, *APMIS* 2007;115(12):1400-8.
 15. Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I, Drobniewski F: Detection of mutations associated with isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Samara Region, Russian Federation, *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4498-502.
 16. O'Riordan P, Schwab U, Logan S et al: Rapid molecular detection of rifampicin resistance facilitates early diagnosis and treatment of multi-drug resistant tuberculosis: case control study, *PLoS ONE* 2008;3(9):e3173.
 17. Pai M, Kalanti S, Dheda K: New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance, *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6(3):423-32.
 18. Pearma JW: 2004 Lowbury lecture: the Western Australian experience with vancomycin-resistant enterococci-from disaster to ongoing control, *J Hospital Infect* 2006;63(1):14-26.
 19. Pfaller MA: Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: practicality and costs, *Emerg Infect Dis* 2001;7(2):312-8.
 20. Rallapalli S, Verghese S, Verma RS: Validation of multiplex PCR strategy for simultaneous detection and identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Indian J Med Microbiol* 2008;26(4):361-4.
 21. Shah NS, Lan NT, Huyen MN et al: Validation of the line-probe assay for rapid detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam, *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13(2):247-52.
 22. Stefani S, Agodi A: Molecular epidemiology of antibiotic resistance, *Intert J Antimicrob Agents* 2000;13(3):143-53.
 23. Subramanian D, Sandoe JA, Keer V, Wilcox MH: Rapid spread of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among high-risk hospital inpatients and the role of molecular typing in outbreak confirmation, *J Hosp Infect* 2003;54(2):99-103.
 24. Thomas CM, Nielsen KM: Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria, *Nat Rev Microb* 2005;3(9):711-21.
 25. Wang JT, Lin SF, Chiu HL et al: Molecular epidemiology and control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a teaching hospital, *J Formos Med Assoc* 2004;103(1):32-6.
 26. Werner G, Coque TM, Hammerum AM et al: Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe, *Euro Surveill* 2008;13(47):1-11.
 27. Wolk DM, Picton E, Johnson D et al: A multicenter evaluation of the Cepheid Xpert™ MRSA test as a rapid screening method for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nares swabs, *J Clin Microbiol* 2009 Jan 7 [Epub ahead of print].