

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDAKİ METİSİLİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE MİKRODİLÜSYON, DİSK DİFÜZYON VE AGAR TARAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Reza A.RAZLIGHI, Şengül DERBENTLİ

ÖZET

S.aureus suşlarında metisilin direncinin ilk kez 1961'de belirlenmesinden sonra, bu suşlarla oluşan hastane infeksiyonu epidemilerine giderek artan sıklıkta rastlanmaktadır. İstanbul Tıp Fakültesi'nde metisiline dirençli *S.aureus* sıklığını ve bu direncin saptanmasında kullanılan farklı yöntemlerin duyarlılığını belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada, çeşitli kliniklerden gönderilen materyalden izole edilen 113 *S.aureus* suşu incelenmiştir.

Suşların % 26.5'inin metisiline dirençli olduğu saptanmış, metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleri duyarlılık ve özgüllük yönünden % 100 uyumlu bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi diğer iki yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığının % 100, özgüllüğünün % 97.5 olduğu belirlenmiştir.

SUMMARY

Comparison of agar screen, disk diffusion and microdilution methods in detecting methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains.

After the recognition of methicillin resistance in *S.aureus* strains in 1961 for the first time, hospital infection epidemics caused by these strains have frequently been observed. The object of this study was to determine the frequency of methicillin resistant *S.aureus* in İstanbul Faculty of Medicine and to compare the sensitivity of various methods used in detecting methicillin resistance. For this purpose 113 *S.aureus* strains from different clinics were examined.

It was found that 26.5 % of the strains were methicillin resistant and that the microdilution and the agar screen methods were found to be 100 % in agreement with respect to sensitivity and specificity. The agreement of the disk diffusion method with the other two methods was determined to be 100 % with respect to sensitivity and 97.5 % with respect to specificity.

GİRİŞ

1940'larda penisilin yaygın kullanımı sonucunda, penisilina üreten penisiline dirençli *S.aureus* suşlarının oluşturduğu hastane epidemileri ortaya çıkmış, 1950'lerde iki veya daha fazla anti-stafilokokal antibiyotige örneğin penisilin, streptomisin, tetrasiklin, eritromisin ve novobiosine dirençli suşlara rastlanmıştır. 1960'larda çoğul antibiyotik direnci gösteren stafilokok infeksiyonlarında hastane infeksiyonu kontrol yöntemlerine, antibiyotiklerin daha bilinçli kullanımına ve penisilina dirençli penisilinlerin kullanım alanına girmesine bağlı olduğu düşünülen, kademeli bir azalma görülmüştür. Ancak bu durum uzun sürmemiş ilk kez 1961 yılında, yani metisilin kullanılmaya başlanmasından 2 yıl sonra metisiline dirençli *S.aureus* suşları (MRSA) bildirilmiş-

tir (10, 16, 25). Bu suşlar 1960'larda Avrupa'daki sağlık kuruluşlarının çoğunda en önde gelen hastane patojeni olmuştur. MRSA'nın Amerika Birleşik Devletleri'ndeki insidansı ve hastanede yatan hastalardaki infeksiyonlar ile bağlantısı 1970'lerin ortalarında artmaya başlamıştır(25). İlk kez 1970'de gentamisine dirençli suşlara da rastlanmış ve bazı suşlarda metisilin ve gentamisin direnci birlikte görülmüştür. Bu suşlar hastane infeksiyonu epidemilerine neden olmaktadır. 1980'lerden bu yana hemen hemen tüm dünyada çoğul dirençli *S.aureus* ile oluşan nozokomiyal infeksiyonlara giderek artan sıklıkta rastlanmaktadır.

MRSA suşları epidemiyolojik açıdan iki tipe ayrılır. Bunlardan birincisi epidemik metisiline dirençli *S.aureus* suşlarıdır. Yayılıcı özellikte olan bu suşlar çoğul antibiyotik direnci gösterirler. İkinci tip MRSA suşları ise nonepidemiktir(10). Bu suşlar sporadik hastane infeksiyonlarına neden olurlar. *S.aureus* etkenli hastane infeksiyonlarında portörlüğün önemi büyüktür. İnsanların ortalama olarak % 40'ının *S.aureus* ile kolonize olduğu, nozokomiyal infeksiyonların % 10 kadarından bu bakterinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Hastane personelindeki el ve burun taşıyıcılığı hastane infeksiyonlarının yayılmasında çok önemli rol oynar. Özellikle deri hastalıkları, yeni doğan, yoğun bakım, başta plastik cerrahi ve yanık üniteleri olmak üzere cerrahi birimlerinde çoğul dirençli stafilokoklar başlıca problem olarak kalmaya devam etmiştir ve bu durum günümüzde de sürmektedir (7, 10, 29).

S.aureus'ta metisilin direnci heterojen ve homojen olmak üzere iki ayrı tipe görülür. Heterojen direnç tipik metisilin direncidir. Bu tip direnç çok az sayıdaki hücrede örneğin 10^4 - 10^8 hücreden sadece bir tanesinde görülür ve bu hücre 50 µg/ml metisilin varlığında dahi üreyebilir. Böyle bir hücre topluluğundaki diğer hücreler ise, antibiyotığın tıbbi açıdan kabul edilebilir konsantrasyonlarına, örneğin 1-5 µg/ml metisiline duyarlıdır. Böyle nisbeten duyarlı hücreler ile, yüksek derecede dirençli hücrelerin karışımından meydana gelmiş olan, yani iki ayrı hücre topluluğu içeren bu suşlara heterojen suşlar adı verilir. *S.aureus* suşlarının pek azında homojen metisilin direnci görülür, yani tüm hücreler metisilinli yüksek konsantrasyonlarına bile direnç gösterir ve bu konsantrasyonda üreyebilir(6).

Metisiline duyarlı *S.aureus* suşları 4 veya 5 farklı PBP (1, 2, 3, 3', 4) oluşturur. Klasik metisilin direnci normal PBP'lerin yanında, PBP2a (veya PBP2') olarak adlandırılan, yeni bir penisilin bağlayan proteinin sentez edilmesi ile ilgilidir. Bir transpeptidaz olduğu düşünülen PBP2a, beta-laktam antibiyotiklere zayıf afinite gösteren bir proteindir. Beta-laktam antibiyotiklere sadece nisbeten yüksek konsantrasyonlarda bağlanabilir. Metisiline dirençli köagülaz negatif stafilokok suşları da PBP2a üretir (6, 8, 26).

PBP2a'nın sentezinden mec geni sorumludur. Bu genin kromozomal olduğu ve plazmid üzerinde bulunmadığı belirlenmiştir. Metisiline duyarlı *S.aureus* suşlarında mec genine eşdeğer bir allel gen bulunmamaktadır. Mec geni her ne kadar kromozomal olsa da, bazı yazarlara göre bu genin transpozon vasıtasıyla beta-laktamaz genini taşıyan plazmide sıçrayarak entegre olduğu iddia edilmektedir (6, 8, 26). Bazı suşlarda PBP2a beta-laktam antibiyotikler ile indüklenebilir. Bu özellik beta-laktamaz plazmidi üzerinde veya beta-laktamaz oluşturmayan suşların kromozomları üzerinde kodlanmıştır. PBP2a'nın sentezi, kültür ortamındaki sıcaklığın 30-35°C olması, inkübasyon süresinin uzaması ve besiyerinin içerdiği tuz oranı gibi koşullara bağlıdır. Birçok araştırmacı PBP2a'nın metisilin direncinin tek açıklayıcısı olmadığını göstermiştir. Metisiline direncin PBP2a'nın yanı sıra hücrenin otolitik aktivitesini düzenleyen mekanizma-

ya da bağı olabileceği ve dirençli suşlarda hücre erimesini geciktiren bir faktörün bulunduğu düşünülmektedir. Kesin olarak tanımlanamayan bu faktör, faktör x olarak adlandırılmıştır (6, 8).

Son yıllarda stafilokoklarda farklı mekanizmalarla da metisilin direncinin ortaya çıktığı bildirilmiştir. "Borderline" veya "edinsel" olarak tanımlanan direnç yalnız yüksek oranda penisilinaz oluşturan *S.aureus* suşlarında görülür. Her ne kadar semisentetik penisilinler, penisilinaza dayanıklı olacak şekilde geliştirilmişse de, aşırı penisilinaz oluşturan suşlar bu antibiyotikleri inaktive edebilirler. Bu mekanizmaya bağlı direnç, plazmidde kodlanır ve beta-laktamaz inhibitörleri ile giderilebilir (8, 19, 20, 24). Bazı stafilokoklar taşıdıkları PBP1 ve PBP2'lerin beta-laktam antibiyotiklere zayıf afinite göstermeleri nedeni ile metisilin direnci gösterirler. Bu tür dirence ise "intermediate" direnç adı verilmektedir (4).

Stafilokoklarda metisilin ve buna bağlı olarak diğer beta-laktam antibiyotiklere direncin doğru ve çabuk belirlenmesi uygun tedaviye başlanmasını, ayrıca pahalı ve toksik tedavinin büyük ölçüde önlenmesini sağlar. Ancak bu direncin heterotipik olarak ortaya çıkması, duyarlılık deneylerinde kritik test koşullarının gerekmesi, rutin deneylerin güvenilirliğini azaltır. Bu nedenle metisiline direncin belirlenmesinde özel fizyolojik deney koşullarında dilüsyon, disk difüzyon ve agar tarama gibi çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Metisilinın MİK değerini süratle belirleyebilen, MS-2 (Abbott laboratories), Autobac I (Organon Technica), Vitek Automicrobic System (Vitek Systems Inc.) gibi otomasyon sistemleri geliştirilmiş olmasına karşın, bu sistemlerle elde edilen sonuçlar güvenilir bulunmamıştır (6, 15). Son yayınlarda DNA prob tekniği kullanarak PBP2a'nın üretimini sağlayan kromozomal genin tayini, metisiline direncin belirlenmesinde en duyarlı yöntem olarak belirlenmiştir. Ancak bu yöntem rutin laboratuvarlarda uygulanamayacak, komplike bir yöntemdir (3).

Penisilinaza dirençli penisilinler grubunda metisilin yanında nafsilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin ve flukloksasilin bulunur. Metisilin direncinin belirlenmesinde in-vitro aktiviteleri birbirinin aynı olması nedeni ile, metisilinın yanı sıra oksasilin veya nafsilin kullanılabilir. Ancak nafsilinın kan ve kan ürünü besiyerlerinden etkilenmesi ve metisilinın laboratuvar koşullarında hızla aktivite kaybetmesi gibi nedenlerle, duyarlılık deneylerinde stabilite yönünden çok daha güçlü olan oksasilin tercih edilir (6, 21).

Bu çalışmanın amacı MRSA suşlarının belirlenmesinde kullanılan mikrodilüsyon, disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin birbirine uyumlarını ve en duyarlı olan yöntemi belirlemek ve İstanbul Tıp Fakültesinde MRSA suşlarının sıklığını saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi kliniklerinden 1992 yılında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 113 *S.aureus* suşunda oksasilin direnci üç ayrı yöntemle aranmıştır.

1. Mikrodilüsyon yöntemi: Bu amaçla NCCLS'm önerdiği yöntem uygulanmıştır (21). *S.aureus* suşlarının katyon ilâveli Mueller-Hinton buyyonundaki 10^7 cfu/ml'lik süspansiyonu ve oksasilinın 0.25-256 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları kullanılmıştır. 35°C 'de 24 saatlik inkübasyondan sonra üreme saptanmayan ilk çukurdaki konsantrasyon (MİK) kaydedilmiştir. Oksasilinın MİK'u ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunan suşlar duyarlı, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunan suşlar ise dirençli olarak yorumlanmıştır.

2. Disk difüzyon yöntemi: Deneyde % 4 NaCl içeren, pH'ı 7.2 olan Mueller-Hinton agar, 1 µg oksasilin içeren kağıt diskler ve 10⁷ cfu/ml'lik bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. İnhibisyon zon çapları ≥13 mm olanlar duyarlı, 11-12 mm olanlar orta duyarlı ve ≤10 mm olanlar dirençli olarak yorumlanmıştır (22).

3. Agar tarama yöntemi: % 4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin içeren Mueller-Hinton agar, Petri kutularına 4 mm kalınlıkta dökülmüş ve 10⁷ cfu/ml'lik bakteri süspansiyonundan 1 µl alınarak nokta inokülüm yapılmıştır. 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, bir tek koloni üremesi bile, metisilin direncinin göstergesi olarak kabul edilmiştir (6, 9, 25).

BULGULAR

Mikrodilüsyon yöntemi ile suşların % 73.5'inin oksasiline duyarlı, % 26.5'inin dirençli olduğu belirlenmiş ve oksasilin denenen suşlara MİK₅₀ değeri 0.25 µg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Oksasilin 113 S.aureus suşuna karşı belirlenen MİK değerleri.

MİK (µg/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8-32	64	128	256
Suş sayısı	67	10	4	2	2	-	1	-	27

Direnc sınırı

Disk difüzyon yöntemi ile suşların % 71.5'inin oksasiline duyarlı, % 0.9'unun orta duyarlı ve % 27.5'inin dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. 113 S.aureus suşunun disk difüzyon yöntemi ile oksasiline karşı belirlenen inhibisyon zon çapları.

İnhibisyon zon çapları (mm)	0	8-10	11-12	13	14-17	18	19
Suş sayısı	28	3	1	-	15	6	60

Dirençli ← → Duyarlı

Agar tarama yöntemi ile, suşların 83'ü (% 73.5) oksasiline duyarlı, 30'u (% 26.5) dirençli bulunmuştur.

Her üç yöntem ile elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleri ile elde edilen sonuçlar duyarlılık ve özgülük yönünden birbirini ile % 100 uyumlu bulunmuştur. Mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleri ile 83 suş, disk difüzyon yönteminde ise 81 suş oksasiline duyarlı olarak bulunduğu, disk difüzyon yönteminin diğer iki yönteme göre duyarlılığı % 100, özgülüğü % 97.5'dir.

NCCLS'e göre oksasilin MİK'u 2 µg/ml olan suşlar duyarlı, 4 µg/ml olan suşlar dirençlidir. Bu çalışmada dört suş için oksasilin MİK değerinin 2-4 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu ya bir borderline ya da intermediate direncin göstergesidir. Bu dört suşdan biri disk difüzyon yöntemi ile de metisiline orta duyarlı bulunmuştur. Bu suşun beta-laktamaz inhibitörlü penisilin türevlerine duyarlı bulunması, direncinin aşırı beta-laktamaz üretimine bağlı borderline direnç olduğunu göstermiştir. Diğer üç suş ise intermediate dirençli suşlar olarak yorumlanmıştır.

TARTIŞMA

S.aureus suşlarında metisilin direncini belirlemede yararlanılan üç yöntem karşılaştırıldığında, mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemlerinin % 100 oranında uyumlu sonuç verdiği belirlenmiştir. Disk difüzyon yönteminde ise direncin % 1.9 oranında daha yüksek bulunduğu saptanmıştır. Mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleri birbirine tam uyan sonuçlar verdiği için, disk difüzyon yöntemine oranla daha duyarlı yöntemler olarak değerlendirilmiştir. Bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yöntemlerde duyarlılığın yanısıra pratik olma özelliği de aranır. Bu özellik yönünden mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleri karşılaştırılırsa, agar tarama yöntemi daha pratik olması nedeni ile metisilin direncinin belirlenmesinde önerilebilir bir yöntem olarak görülmektedir. Ancak bu yöntemin uygulanmasında, antibiyotikli besiyerinin stabilitesine dikkat edilmelidir.

S.aureus suşlarındaki metisiline direnç oranları hastaneden hastaneye ve direncin belirlenmesinde uygulanan yöntemlere bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Çeşitli çalışmalarda *S.aureus* suşlarında belirlenen metisilin direnci.

Kaynak	%
Akalın ve ark. (Ankara-1987) (1)	48
Fidalgo ve ark. (İspanya-1987) (12)	13.9
Baykal ve ark. (Ankara-1988) (4)	28
Ertuğrul ve ark. (Ankara-1988) (11)	30
Töreci ve ark. (İstanbul-1988) (27)	31.7
Lewis ve ark. (İngiltere-1988) (18)	24.1
Özsan ve ark. (Ankara-1989) (23)	28
Gürler ve ark. (İstanbul-1989) (13)	59
Köksal ve ark. (Trabzon-1990) (17)	13
Ünal ve ark. (Ankara-1990) (28)	37
Akgül (İstanbul-1990) (2)	31.7
Benzonana ve ark. (İstanbul-1991) (5)	1.5
Bu çalışma (İstanbul-1992)	26.5

İstanbul Tıp Fakültesi'nde yapılan üç ayrı çalışmanın bulguları karşılaştırıldığında; bu çalışmada belirlenen metisilin direnci (% 26.5), 1988'de yapılan ve aynı oranın % 31.7 olarak belirlendiği araştırmanın sonucu ile oldukça uyumlu bulunmuştur. 1989'da saptanan yüksek metisilin direncine (% 59) karşılık, 1992'de bu oranın düşük bulunması (% 26.5), hastane infeksiyonu kontrolüne ilişkin çalışmaların 1990 yılından başlayarak yaygınlaştırılmasına bağlanabilir.

KAYNAKLAR

- 1- Akalın H E, Çelik E, Baykal M, Kardeş T: Metisiline dirençli Staphylococcus'ların bazı antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları, *ANKEM Derg 1*: 22 (1987).
- 2- Akgül A: Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde metisiline rezistan S.aureus sürveyasında broth mikrodilüsyon, agar tarama yöntemlerinin değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, İstanbul (1990).
- 3- Archer G L, Pennell E: Detection of methicillin resistance in staphylococci by using a DNA probe, *Antimicrob Agents Chemother 34*: 1720 (1990).
- 4- Baykal M, Kanra G, Akalın H E: Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg 2*: 106 (1988).
- 5- Benzonana N A, Akgül A, Dündar V, Bilgin S, Mansur T, Selçuk S: Toplumdan kazanılmış cilt infeksiyonlarından izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının oksasiline ve diğer antibiyotiklere direnci, *Türk Mikrobiyol Cem Derg 21*: 123 (1991).
- 6- Chambers H F: Methicillin resistant staphylococci, *Clin Microbiol Rev 1*: 173 (1988).
- 7- Cohen M L: Staphylococcus aureus: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology, *J Pediatr 38*: 796 (1988).
- 8- Cookson B, Phillips I: Methicillin-resistant staphylococci, *J Appl Bacteriol (Symposium Suppl)* s.55 (1990).
- 9- Corrinine J, Hack B, Chambers H F: Methicillin-resistant staphylococci detection methods and treatment of infections, *Antimicrob Agents Chemother 33*: 997 (1983).
- 10- Dukworth G J, Lothian E-L, Williams J D: Methicillin-resistant S.aureus, Report of an outbreak in a London teaching hospital, *J Hosp Infect 11*: 1 (1988).
- 11- Ertuğrul N, Başkaya İ, Tural D, Altay G: Stafilokok suşlarının penisilin, oksasilin, vankomisin ve ampisilin-sulbaktama duyarlılıkları, *ANKEM Derg 2*:108 (1988).
- 12- Fidalgo S, Madez F J, Harrison C, Salas J A: Epidemiology of macrolide and lincosamide resistance in species of staphylococci in a general hospital, *J Hosp Infect 11*: 36 (1988).
- 13- Gürler N, Sarpel C, Töreci K, Çetin E T: Muayene maddelerinden izole edilen S.aureus suşlarının kemoterapötiklere duyarlılığı, *ANKEM Derg 3*: 189 (1989).
- 14- Hackbarth C J, Chambers H F: Methicillin resistant staphylococci: Detection methods and treatment of infections, *Antimicrob Agents Chemother 33*: 995 (1989).
- 15- Hansen S L, Freedy P K: Variation in the abilities of automated, commercial and reference methods to detect methicillin resistant (heteroresistant) Staphylococcus aureus, *J Clin Microbiol 20*: 494 (1984).
- 16- Kloos W E, Lambe D W: Staphylococcus "A Balows, W J Hausler, K L Herrmann, H D Isenberg, H J Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.222, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
- 17- Köksal İ, Koç H: Beta-laktamaz meydana getiren stafilokok suşlarının belirlenmesi ve antibiyotik direnci, *ANKEM Derg 4*: 234 (1990).
- 18- Lewis M J: Resistance to antimicrobial agents, "D Greenwood (ed): *Antimicrobial Chemotherapy*" kitabında s.109, Bailliére Tindall, London (1988).
- 19- Liu H, Buescher G, Lewis N, Synder S, Junkind D: Detection of borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus and differentiation from methicillin resistant strains, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9*: 717 (1990).
- 20- McDougal L, Thornsberry C: The role of beta lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins, *J Clin Microbiol 23*: 832 (1986).
- 21- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Tentative Standards M7-T2: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*, 2. baskı, Villanova (1988).
- 22- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Tentative Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, 4. baskı, Villanova (1988).
- 23- Özsan M, Tan G, Özenci H: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının antibakteriyellere duyarlılıkları, *Mikrobiyol Bül 23*: 246 (1989).

- 24- Sierra-Madero J G, Knapp C, Karaffa C, Washington J A: Role of beta lactamase and different testing conditions in oxacillin-borderline-susceptible staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1754 (1988).
- 25- Thornsberry C: Methicillin-resistant (Heteroresistant) staphylococci, *Antimicrob Newsletter* 1: 43 (1984).
- 26- Tomasz A, Drugeon H B, de Lencastre H M, Jabes D, McDougall L, Bille J: New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity, *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1869 (1989).
- 27- Töreci K, Gürler N, Çalangu S, Sarpel C, Eraksoy H, Özsüt H, Çetin E T: Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated in İstanbul, *ANKEM Derg* 2: 265 (1988).
- 28- Ünal S, Korten V, Gür D, Akalın H E, Baykal M: Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında methicillin direnci, *ANKEM Derg* 4: 235 (1990).
- 29- Vanderbroucke G, Frenay H M E, Van Klingeren C, Sevelkoul T F: Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Dutch university hospital, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 6 (1991).