

Providencia stuartii moleküler tipleme için pulsed-field jel elektroforezinin optimizasyonu

Optimization of the pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Providencia stuartii

Alper Karagöz, Dilek Güldemir, Rıza Durmaz

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; Türkiye Halk Sağlığı Kurumuna bağlı Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında *Providencia stuartii*'nin tiplemesinde kullanılmak üzere optimize edilmiş bir "pulsed-field jel elektroforezi" (PFGE) protokolü sunulmuştur.

Yöntemler: Gram-negatif bakterilere ait daha önceki PFGE protokolleri ile kıyaslandığında; *SpeI* enziminin bu bakteri için uygun olduğu ve elektroforez koşullarının; 1. blok için başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 40 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 19 saat; 2. blok için başlangıç vuruş süresi 35 sn, bitiş vuruş süresi 45 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 5 saat; TBE tamponu pH=8.4 şeklinde olması gerektiği ortaya konmuştur. Filogenetik analizler Bionumerics yazılım sistemi (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium) ile değerlendirilmiştir.

Bulgular ve sonuç: Optimize edilen yöntem basit, tekrarlanabilir ve *P. stuartii* için kullanıma uygun bulunmuştur. Çalışılan bakterilere bağlı salgınları değerlendirme ve hastane enfeksiyonlarının yaygınlık derecesi hakkında yararlı bilgiler sunma potansiyeli vardır. Optimize edilen bu protokol, farklı merkezlere ait PFGE sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılmasına da olanak sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: *Providencia stuartii*, moleküler tipleme, pulsed-field jel elektroforezi

ABSTRACT

Objective: In this study, "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE) protocol was optimized for use *Providencia stuartii*'s typing in Molecular Microbiology Research and Application Laboratory, Public Health Agency of Turkey.

Methods: This protocol compared with Gram-negative bacteria PFGE protocols, *SpeI* enzyme is suitable for this bacterium. Electrophoresis conditions should be revealed as 1. block: initial pulse duration 5 sec, ending pulse duration 40 sec, striking angle 120°, the current 6 V/cm², temperature 14°C, time 19 hours; 2. block: initial pulse duration 35 sec, ending pulse duration 45 sec, striking angle 120°, the current 6 V/cm², temperature 14°C, time 5 hours; TBE buffer pH=8.4. Phylogenetic analyzes were evaluated with Bionumerics software system (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Results and conclusion: This procedure is simple, reproducible and suitable for *P. stuartii*. It has the potential evaluating the outbreaks due to bacteria performed, and providing useful information about the prevalence of nosocomial infections. This optimized protocol is allowed different centers' PFGE results to compare with other laboratories results.

Key words: *Providencia stuartii*, molecular typing, pulsed-field gel electrophoresis.

GİRİŞ

Providencia, *Enterobacteriaceae* ailesinin Gram-negatif, hareketli bir üyesidir. *Providencia stuartii* insanlarda fırsatçı patojendir, etken olduğu enfeksiyonlar arasında en sık rastlanılanı idrar yolu enfeksiyonları olup özellikle uzun süreli üreter kateter kullananlarda enfeksiyona yol açar [1]. *P. stuartii* hastane enfeksiyonu etkeni olarak son

yıllarda ön plana çıkan bir bakteridir [1]. Önceki çalışmalarda, bu bakteriyle oluşan hastane kaynaklı enfeksiyon salgınlarında, kaynağı bulmak için "O" antijenlerine göre serotip saptaması yapılabileceği veya plazmid analizine başvurulabileceğinden bahsedilmektedir [1,2]. Günümüzde *P. stuartii* ile oluşan salgınların saptanması için suşlar arasında klonal (genetik) ilişkinin belirlenmesine yönelik

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara.

Yazışma Adresi /Correspondence: Dilek Güldemir,

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Ankara-Türkiye

Email: dilekg06@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received: 29.04.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 13.05.2013

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2013, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) gibi yöntemlere ihtiyaç vardır [3,4].

P. stuartii suşlarının moleküler analizi ve suşlar arasındaki farklılıkların tespiti, uygulanan yöntemin değerlendirilmesi açısından son derece önemlidir. *P. stuartii* suşlarının epidemiyolojik sürveyansı ve salgınla ilişkili suşların tanımlanabilmesi için 1990'lı yılların başından bu yana PFGE yöntemi kullanılmaktadır. Günümüzde *P. stuartii* için standardize bir PFGE yöntemi bulunamayışı nedeniyle laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılabilmesinde çeşitli güçlükler yaşanmaktadır. Ayrıca diğer moleküler tipleme metotları ile birbirinden ayırt edilemeyen suşların epidemiyolojik ilişkisini günümüzde en iyi saptayan yöntemin PFGE olduğu da bilinmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız; ülkemiz için referans laboratuvar niteliğinde olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumuna bağlı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı bünyesindeki Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında *P. stuartii* suşlarının moleküler analizi için standart bir PFGE yöntemi geliştirmektir.

Moleküler tipleme yöntemleri kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koyarak, salgınların kaynağı, bulaş yolları ve bulaşın derecesi hakkında oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır. Bakteriler arasındaki klonal ilişkiyi araştırmada farklı moleküler tipleme yöntemleri denenmektedir [5,6,7]. Bunlar arasında ayırım gücü en yüksek olan PFGE yöntemidir [8-10]. Altın standart olarak kabul edilen bu yöntemin, en önemli dezavantajı, farklı laboratuvarlarda değişik protokollerin uygulanması nedeniyle sonuçların birbirleriyle kıyaslanma olanağının olmamasıdır [11-13]. Araştırmacılar bu sorunu gidermek için çok fazla çaba harcamaktadırlar. Birçok bakteri türünün moleküler tiplemesinde kullanılabilecek, kısa sürede sonuçlanan ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilen sonuçlar alınabilecek PFGE protokolleri üzerinde çalışılmaktadır [14,15,16]. Bu çalışmada da buna imkan sağlayabilecek bir protokolün ayrıntıları sunulmuştur.

YÖNTEMLER

PFGE yöntemi; agaroz içine gömülü haldeki bakteriden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun, restriksiyon enzimi (RE) ile kesim profilinin belirlenmesi esasına dayanır. Yöntemde başlıca şu aşamalar bulunmaktadır; çalışılacak

bakterinin hazırlanması, bakterinin agarozla karıştırılması, agaroz içerisindeki bakterinin parçalanması (*in situ* lysis), agaroz içerisindeki kromozomun saflaştırılması, agaroz içerisindeki kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi (*in situ* digestion), elektroforezle DNA parçalarının ayrıştırılması, DNA bantların görünür hale getirilmesi ve sonuçların yorumlanması [17,18].

A- İzolatların hazırlanması [19,20]

1. Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakteri, kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi ile inoküle edilir.
2. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilir.
3. Besiyerindeki saf koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakılır.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler öze ile alınarak, 1 ml hücre süspansiyonu tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, pH=8.0; 100 mM EDTA) içerisinde süspansiyon edilir.
5. Hücre süspansiyonu, 2500xg ve 4°C'de 15 dakika (alternatif olarak 13000xg ve 4°C'de 2 dakika) santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır. Tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır.

Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UVNis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlanır. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agarozla gömülecek ise oda ısısında, değilse kırık buz içerisinde bekletilir.

B- İzolatların agarozla gömülmesi [3,21,22]

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlanır.
- 0.2 g agaroz, 100 ml'lik balona konular. Üzerine 9 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır. Tekrar 2-3 saniye mikrodalga fırında tutulur. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalga fırında tutma işlemi tekrarlanır. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon

45-50°C'lik su banyosuna konulur. %10'luk sodyum dodezil sülfattan (SDS-50°C'de ısıtılmış) 1 ml eklenerek iyice karıştırılır. Agaroz-SDS karışımından 200 µl Ependorf tüplere dağıtılır ve 45-50°C'deki su banyosunda (veya kuru ısı bloğunda) bekletilir.

2- Agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtulur.

3- HST içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısılı agaroz-SDS karışımı bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içerisinde homojen dağılması sağlanır.

4- Bekletilmeden ve hava kabarcığı olmayacak şekilde, hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıbına (10 mm x 5 mm x 1.5 mm, Sio Rad Laboratories) 100 µl dağıtılır. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de 10 dakika bekletilir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen karışması sağlanmaktadır.

C- Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması [4]

5 ml'lik steril kapaklı tüplere 0.5 ml hücre lizis solüsyonu-1 (HLS-1: 50 mM Tris-HCl, pH=8.0; 50 mM EDTA; 2.5 mg/ml lizozim; 1.5 mg/ml proteinaz K) konulur. (Not: lizozim ve proteinaz K parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklenecektir)

6 mL HLS-1 hazırlamak için:

Proteinaz K (10 mg/ml)	900 µl
Lizozim (100 mg/ml)	150 µl
10X TE (0.5 M Tris-HCl, pH=8.4; 0.5 M EDTA)	600 µl
Distile su	4350 µl

İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilir. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir (Not: Tüp su banyosuna hafif yatık pozisyonda yerleştirilmelidir). HLS-1 dökülerek, yerine 0.5 ml hücre lizis solüsyonu-2 (HLS-2: 0.5 M EDTA; %1 sarkozil; 400 µg/ml proteinaz K) konulur. (Not: Proteinaz K parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklenecektir)

6 mL HLS-2 hazırlamak için:

Proteinaz K (10 mg/ml)	240 µl
10X SE (5 M EDTA; %10 sarkozil)	600 µl
Distile su	5160 µl

55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

D- Hücre lizisinden sonra agaroz kalıplarının yıkanması [3,4]

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilir. HLS-2 dikkatlice aspire edilir. İçerisinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletilir (su ile yıkama işlemi). Su tamamen aspire edilir. Su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlanır. Su tamamen aspire edildikten sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere) 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH=7.6; 0.1 mM EDTA) tamponuyla yıkanır (Not: Yıkama sonrası agaroz kalıpları şeffaflaşır). Böylece içerisinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

E- Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

P. stuartii için etkinliği daha önce araştırılmış olan *SpeI* enzimi kullanılmıştır [5,7]. *P. stuartii* DNA'sını içeren kalıpların *SpeI* RE ile kesimi aşağıdaki şekilde yapılır.

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/4 oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 µl 1X *SpeI* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletilir. (Not: Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde saklanır). Sonra sıvı aspire edilir. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10X <i>SpeI</i> tamponu	10 µl
<i>SpeI</i> enzimi (10 U/µl) (Promega Corporation, WI, USA)	3 µl
Steril ultra saf su (Reagent Grade Type)	87 µl

Bu karışımın içerisine enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir [5]. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

F- Elektroforez için jelin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi [3]

1. 0.5X TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH=8.0) içerisine 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) aşağıdaki şekilde hazırlanır.

i. 1 g “pulsed-field certified agarose” 200 ml’lik balonun içerisine konulur.

ii. Üzerine 100 ml 0.5X TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.

iii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkartılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırında tutulur.

iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konur.

Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırma-ması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulur. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklenir. Kurutma kağıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelecek şekilde tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir. Su banyosundan çıkartılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1’lik agarozla doldurulabilir. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900-2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

G- Elektroforez

P. stuartii için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

1. blok: başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 40 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 19 saat.

2. blok: başlangıç vuruş süresi 35 sn, bitiş vuruş süresi 45 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 5 saat.

TBE tamponu, pH=8.4.

H- Sonucun gözlenmesi ve analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika süreyle boyanır. UV ışığı altında görüntülenir. Ayrım

gücü 1708x1280 pixel olan Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kayıt edilir.

Bionumerics yazılım sistemi (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edilir. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1., 7. ve 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapılır. “Unweighted pair group method with mathematical averaging” (UPGMA) kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturulur ve kümeleşme analizi yapılır. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenir. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı %1-1.5 olarak alınır. Tenover ve ark. [15] tarafından geliştirilmiş kriterler kullanılarak izolatlar; aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirilir.

Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlardır. Bu izolatlar, genetik olarak fark-sız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidirler.

Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.

Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.

İlişkisiz izolatlar: Aralarında ≥ 7 bant farkı olan suşlardır. Salgınla ilişkileri olmayan suşlardır.

I- Çalışma solüsyonları

i. HLS-1 için 10X TE (pH=8.0) çözeltisi;

2 M Tris-HCl	50 ml
0.5 M EDTA	20 ml
Distile su	930 ml

ii. HLS-2 için 1X SE çözeltisi;

0.5 M EDTA
%1 sarkozil

iii. HST-1 (pH=8.0) çözeltisi;

100 mM Tris-HCl
100 mM EDTA

iv. 2 M Tris-HCl (pH=8) stok çözeltisi;

Tris base (sigma)	10,6 g
Tris-HCl (sigma)	17,7 g
Mili Q	100 ml

v. Tris-EDTA (TE) buffer (pH=7.4-8.0) çözeltisi;

1X TE için 1 M Tris-HCl 10 ml

0.5 M EDTA 2 ml

Distile su 988 ml

vi. TE (wash buffer) (pH=7,4) çözeltisi;

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA

Yaptığımız çalışmalar sırasında; *P. stuartii* için kalıp hazırlama, kalıptaki bakterinin parçalanması ve kalıpların yıkanması aşamalarında kullanılabilen bir protokol oluşturulmuş, *P. stuartii*'nin moleküler tiplemesinde kullanılacak ve çalışmanın ertesi günü sonuç alınabilen kısa süreli bir PFGE protokolü geliştirilmiş ve geliştirilen protokolün laboratuvar içi tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Çalışmalarımız sayesinde; *P. stuartii* için PFGE yöntemini optimize edebildiğimizi ve *P. stuartii*'ye yönelik moleküler yöntemlerin kalite güvencesinin sağlanması (iç kalite kontrolü, EQAS programlarına katılım) için gerekli bilgi ve tecrübemizi artırdığımızı söyleyebiliriz. Bu alanda ülkemizde bir ilk olan araştırmamızın, bize ve yakın gelecekte bu alanda çalışmak isteyenlere önemli veri sağlayacağını ve konu ile ilgili yeni çalışmaların planlanmasına olanak tanıyacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Ang Ö, Öz V, Tellaloğlu S, et al. *Providencia stuartii*'nin etken olduğu idrar yolu enfeksiyonları. Türk Üroloji Dergisi 1986;12:221-226.
2. Bahar G, Erac B, Mert A, et al. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. J Chemother 2004;16:343-346.
3. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. J Antimicrob Chemother 2006;57:979-982.
4. Centers for Disease Control and Prevention: Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). (http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf)
5. Guducuoglu H, Durmaz R, Yaman G, et al. Spread of a single clone *Acinetobacter baumannii* strain in an intensive care unit of a teaching hospital in Turkey. New Microbiol 2005;28:337-343.
6. Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, et al. Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. J Clin Microbiol 2006;44:4049-4056.
7. Maslow JN, Glaze T, Adams P, et al. Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:69-75.
8. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing HD, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington DC. ASM Press, 1993;563-572.
9. Naseer U, Natas OB, Haldorsen BC, et al. Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing *E. coli* in Norway. APMIS 2007;115:120-126.
10. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, et al. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 2001;39:1889-1894.
11. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. Clin Infect Dis 2006;42:37-45.
12. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2005;43:4328-4335.
13. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. J Clin Microbiol 1995;33:1402-1407.
14. Stephens C, Francis SJ, Abell V, et al. Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. Am J Infect Control 2007;35:212-215.
15. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol 1997;18:426-439.
16. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, et al. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2000;38:4242-4245.
17. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clin Microbiol Infect 2007;13:481-489.
18. Pazhani GP, Niyogi SK, Singh AK, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella species* isolated from epidemic and endemic cases of shigellosis in India. J Med Microbiol 2008;57:856-863.
19. Gaynor K, Park SY, Kanenaka R, et al. International foodborne outbreak of *Shigella sonnei* infection in airline passengers. Epidemiol Infect 2009;137:335-341.
20. Saran B, Erdem B, Tekeli FA, et al. Ankara'da izole edilen *Shigella* kökenlerinin antibiyotik direnç modelleri, plazmid profil analizi ve değişken alanlı jel elektroforezi ile incelenmesi. Mikrobiyol Bul 2013;47:35-48.
21. Akçalı A, Levent B, Akbaş E, et al. Türkiye'nin bazı illerinde izole edilen *Shigella sonnei* suşlarının antimikrobiyal direnç ve "Pulsed Field" jel elektroforezi yöntemleri ile tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2008;42:563-572.
22. Pfaller M. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. Emerg Infect Dis 2001;7:312-318.