مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۱۳-۲۰

مقـایسه نتایج روش های PCR و اگزاسیلین آگار اسکرینینگ در تعیین مقاومت به متی سیلین در سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ایزوله شده از کشت خون کودکان

سعید شجاع[۱]، محمد رضا نهائی*[۱،۲]، صفر فرج نیا[۲،۳]، محمد آهنگر زاده رضایی[۱]، سولماز نیک وش[۴]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲) مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۳) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴) مرکز آموزشی درمانی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
نویسنده رابط: محمد رضا نهائی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
تلفن: ۳۳۶۴۶۶۱-۰۴۱۱ nahaeimr@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: در سال های اخیر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متـی سـیلین نقـش فزاینـده ای را در عفونـت هـای خـون نوزادان و کودکان داشته است. تشخیص صحیح مقاومت در این باکتری ها جهت درمان این بیماران ضـروری اسـت. هـدف از ایـن مطالعه ارزیابی ارزش تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با ۳ رقت مختلـف اگزاسـیلین و مقایسه آنهـا بـا نتـایج PCR در شناسـایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین بود.

روش بررسی: بر روی ۱۰۰ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از کشت خون نوزادان و کودکان تست تعیـین حـساسیت با استفاده از اگزاسیلین آگار اسکرینینگ حاوی رقت های ۰/۶µg/ml، ۴µg/ml و ۶µg /ml انجـام شـد. ضـمناً تمـامی نمونـه هـا بـا روش PCR جهت جستجوی ژن *mec*A بررسی شدند.

یافته ها: با روش PCR در ۸۹ سویه آزمایشی ژن *mec*A شناسایی شد، اگزاسیلین آگار اسـکرینینگ حـاوی ۰/۶ µg/ml در مـدت ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۸۵ و ۸۹ سویه مقاوم را شناسایی کرد، اما رقت ۴ µg/ml در همین زمانها به ترتیب ۷۸ و۸۹ سویه مقـاوم را تعیین هویت نمود. بالاخره رقت ۶ µg /ml تعداد ۶۷ و ۷۵ سویه مقاوم را شناسایی کرد.

نتیجه گیری: تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با رقت های ۰/۶ µg/ml و ۴ µg /ml در مدت ۴۸ ساعت دارای حـساسیت و ویژگـی معادل PCR بود در صورتی که رقت ۶ µg/ml حساسیت کمی در جداسازی این سویه ها نشان داد. بنابراین تست اگزاسیلین آگـار اسکرینینگ با رقت های ۰/۶ µg/ml و ۴ µg/ml با زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته به دلیل قیمت ارزان و در دسترس بودن یـک تـست مناسب جهت تشخیص سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین می باشد.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، متی سیلین، اگزاسیلین آگار اسکرینینگ، ژن *mec*A

مقدمه:

در سال های اخیر استافیلوکوکوس هـای کواگـولاز منفـی بـه ویـژه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نقش فزاینـده ای را در عفونـت هـای بیمارستانی دارد. این باکتری عامل عفونت کاترهـای درون رگـی و عفـونت خون بیمـارستانی در بخش مـراقبت هـــای ویـژه نـوزادان می باشد (۴-۱). شناسایی الگوی مقاومت و تحمل *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به مواد ضد میکروبی جهت درمان مناسب عفونت های ناشی از این باکتری ضروری است (۵). مهمترین مشکل در مواجهـه با این باکتری مقاومت آنتی بیوتیکی آن می باشد به طوری که حدود ۹۰٪ ایزوله های بیمارستانی این باکتری به متی سیلین مقاومنـد (۳)، و این سویه های مقاوم بـه متـی سـیلین عـلاوه بـر اینکـه بـه تمـام داروهای بتالاکتام مقاومـت دارنـد (۵) اغلـب بـه دیگـر مـواد ضـد میکروبی نظیر فلورو کینولون ها، آمینو گلیکوزیـد هـا، تتراسـیکلین، ماکرولید ها و تری متـوپریم سـولفا متوکـسازول نیـز مقاومنـد (۶). مکانیـــسم عمـــده مقاومـــت بـــه متـــی ســـیلین تولیـــد یـــک PBP(Penicillin Binding Protein) تغییـر یافتـه بـه نـام PBP2a می باشد کـه تمایـل کمـی را بـرای اتـصال بـه داروهـای بتالاکتام داشته و توسط این داروهـا مهـار نمـی گـردد (۷، ۸). یـک قطعه اضافی از DNA کروموزومی با طول تقریبی ۵۰-۳۰ کیلوباز به نام *mec* در استافیلوکوکوس های مقاوم بـه متـی سـیلین وجـود دارد کـــه هـــیچ آلـــل مـــشابهی از آن در استافیلـوکـوکـــوس هـــای حساس به متی سیلین موجـود نیـست. *mecA* کـه ژن سـاختمانی بـــرای تولیـد PBP2a اسـت درون قـسمت *mec* قـرار دارد (۹). درمان استافیلوکوکوس های حسـاس بـه متی سـیلین بـا اسـتفاده از پنی سیلین هـای مقـاوم بـه بتالاکتامـاز انجـام مـی پـذیرد (۱۰). در صورتیکه درمان سویه هـای مقـاوم بـه متـی سـیلین بـا اسـتفاده از وانکومایسین می باشد (۱۱). با این وجود هنـوز پزشـکان بـه دلیـل اینکه از صحت تست های شناسایی مقاومت به متی سیلین مطمـئن نیستند اغلب عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس های حساس بـه متی سیلین را با وانکومایسین درمان می کنند (۱۰). نظـر بـه وجـود گـزارش هـــایی از مـوارد مقاومـت بـه وانکومایـسین در بـین ایـن باکتری ها (۱۴-۱۲)، یک روش مناسـب جهـت شناسـایی سـریع و صحیح مقاومت به متی سیلین برای مشخص کردن یک دوره درمانی مناسب ضروری بوده و می تواند مصرف غیر ضروری وانکومایسین را کنترل کند (۱۱، ۱۵). شناسـایی ژن *mecA* بوسـیله PCR روش اسـتاندارد طلائـی جهـت شناسـایی مقاومـت بـه متـی سـیلین در استافیلوکوکوس ها می باشد (۷). روش هـای توصـیه شـده توسـط (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI برای شناسایی مقاومت به متی سـیلین در اسـتافیلوکوک هـا شـامل: تعیین MIC در محیط کشت جامد یـا مـایع، آگـار اسـکرینینگ و دیسک آگار دیفیوژن می باشد (۱۶). با وجود اینکـه CLSI تـست اگزاسیلین آگـار اسکرینینگ را فقط بـــرای شناســـایی مقاومـت بـه متی سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* توصـیه کـرده اسـت (۱۶)، برخی از محققین گزارش هایی مبنی بر کاربرد تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با استفاده از رقت های کمتر اگزاسیلین بـه عنـوان یـک تـــست حـــساس در شناســـایی مقـــاومت بـــه متـــی ســـیلین در استافیلوکوک های کواگـولاز منفـی منتـشر نمـوده انـد(۷، ۱۹-۱۷). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ بـا اسـتفاده از رقـت هـای ۰/۶ µg/ml، ۴ µg/ml و ۶µg/ml اگزاسیلیـن و مقـایسه نتایج آن با PCR در شناسـایی مقاومـت بـه متی سیلین در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود.

مواد و روش ها:

در فـاصلـه زمـانی ۱۱ مـاه (از شهریـور ۱۳۸۵ تـا تیـر۱۳۸۶) در بیمارسـتان کودکان تبریز از کشت خون ۲۹۴۳ بیمار با علائم تب و سپتی سمی تعـداد ۱۰۰ ایزولـه *استـافیلـوکوکوس اپیدرمیدیس* جمع آوری شد که محدوده سنی بیماران، ۱ روز تا ۱۰ سال بود. باکتری های ایزوله شده با استفاده از روش های استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز لوله و لام، مقاومت به باسیتراسین و حساسیت به نوبیوسین تعیین هویت شدند (۲۰). تمام ایزوله ها تا زمان استفاده در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول در $^{\circ}C$ ۷۰- نگهداری شدند (۲۱). برای انجام آزمایش های مورد نظر، باکتری های ذخیره شده از فریزر خارج و پس از ذوب در دمای اتاق کشت لازم به عمل آمد که پس از حصول رشد برای انجام تست های PCR و اگزاسیلین آگار اسکرینینگ مورد استفاده قرارگرفتند.

روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ:

در این روش به محیط کشت مولر هینتون آگار مقدار ۴٪ نمک (NaCl) اضافه شده و پلیت حاوی رقت های ۰/۶µg/ ml، ۴µg/ml و ۶µg/ml اگزاسیلین تهیـه شد. سپس از هـر ایزولـه باکتری سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و کشت باکتری ها بر روی پلیت ها طبق دستور العمل CLSI انجام شد (۱۶). بدین صورت که یک سواپ را به سوسپانسیون باکتری آغشته کرده و پس از گرفتن مایع اضافی باکتری ها را به صورت Spot در ناحیه ای به قطر ۱۵-۱۰ میلی متر کشت داده و سپس در یک

قسمت دیگر پلیت باکتری ها را به صورت خطی کشت داده، پلیت ها در دمای $^{\circ}C$۳۳ انکوبه شده و نتایج بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. رشد حتی بیش از یک کلنی به عنوان نتیجه مثبت بوده و نشان دهنده مقاومت باکتری نسبت به متی سیلین می باشد (شکل۱). در این تست برای تمامی رقت ها از *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 به عنوان کنترل منفی (حساس به متی سیلین) و سویه ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت (مقاوم به متی سیلین) استفاده گردید (شکل۲).

استخراج DNA:

باکتری های آزمایشی در ۵ میلی لیتر از محیط (Loria Bertoni) LB کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$۳۷ انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت حاوی سلول های باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ گردیده و رسوب در ۴۰۰ µl بافر TE((Tris 10mM, EDTA 1mM (pH 8.0) حل گردید. مقدار ۴۰µl از سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰٪ و ۷µl پروتئیناز K با غلظت ۲۰ µg/ml به منظور لیز کردن سلول های باکتری به میکروتیوب اضافه و به مدت یک شب در $^{\circ}C$۴۰ انکوبه گردید. سپس ۸۰ µl CTAB (Cetyl Trimethyl Amonium Bromide) در سدیم کلراید ۱ مولار و ۱۰۰ µl سدیم کلراید ۵ مولار به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در $^{\circ}C$۶۵ انکوبه گردید. در مرحله بعد ۷۰۰ µl کلروفرم به میکروتیوب اضافه کرده، به آرامی به هم زده و سپس به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. فاز فوقانی به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و ۰/۶حجم (۴۲۰µl) از ایزو پروپانول به لوله اضافه و به مدت نیم ساعت در $^{\circ}C$۲۰- قرار داده شد. پس از آن تیوب به مدت ۱۰دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ وپس از بیرون ریختن محلول روئی، رسوب با ۱ ml اتانول ۷۰٪ شستشو داده و نهایتاً رسوب پس از خشک شدن در ۵۰µl از بافر TE حل گردیده و غلظت DNA با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین و در $^{\circ}C$۲۰- نگهداری شد (۲۲).

:PCR

DNA استخراج شده به همراه پرایمر های اختصاصی ژن *mec*A شامل:

F:mecA1 (5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3′)
و R:mecA2 (5′_AATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3′)

درواکنش RPC وارد گردید (۲۳، ۲۴). مخلوط واکنش شامل ۱۰pmol از هر پرایمر، ۲۰۰ µM از dNTP ، ۱/۵ mM $MgCl_2$ ، دو واحد از آنزیم Taq DNA polymerase بود. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در $^{\circ}C$۹۴ برای ۴ دقیقه و به دنبال آن سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون در $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در $^{\circ}C$ ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردیده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکیومنت جهت مشاهده قطعه ای با طول ۳۰۷ جفت باز بررسی و عکسبرداری گردید (۲۵).

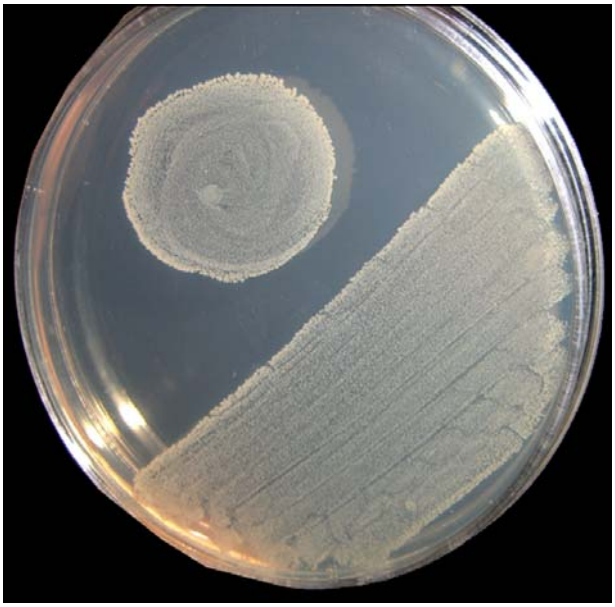
نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آماره های توصیفی از تعداد و درصد استفاده شد و جهت مقایسه حساسیت و ویژگی تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ در مقایسه با PCR از آزمون کای دو استفاده گردید.

یافته ها:

نتایج روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون با استفاده از نور چراغ مطالعه بررسی شد که رشد بیش از یک کلنی بر روی محیط کشت به عنوان نتیجه مثبت و مقاومت به متی سیلین در نظر گرفته شد. این نتایج در جدول۱ نشان داده شده است.

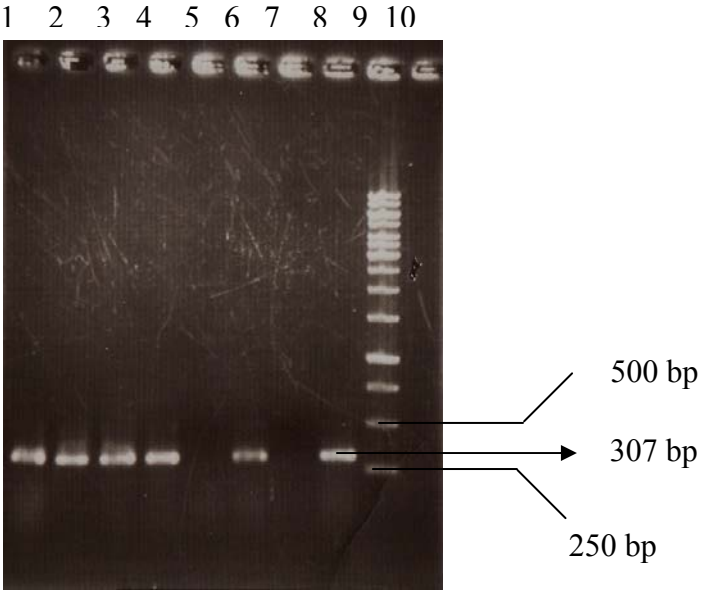
در روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *mec*A تکثیر گردید که به صورت باند واضحی با طول۳۰۷ جفت باز مشاهده شد. جهت اطمینان از صحت تست PCR، در همه واکنش ها از کنترل مثبت شامل DNA *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 (مقاوم به متی سیلین و دارای ژن *mec*A) و کنترل منفی DNA *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 (حساس به متی سیلین و فاقد ژن *mec*A) استفاده شد. از بین ۱۰۰ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد مطالعه ۸۹ مورد واجد ژن *mec*A و ۱۱ مورد فاقد این ژن بودند (شکل ۳). حساسیت و ویژگی روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ در مقایسه با PCR تعیین شده و در جدول ۱ نشان داده شده است.

شکل ۱: نتیجه مثبت باکتری های آزمایش شده (مقاومت به متی سیلین) در روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ



شکل ۲: نتایج حاصل از تست سویه های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* در پلیت های حاوی ۰/۶ µg/ml، ۴µg/ ml ، ۶ µg/ ml اگزاسیلین

شکل ۳ : نتایج PCR در شنا سایی ژن *mec*A در ۶ ایزوله *S. epidermidis* مورد مطالعه



ستون های: ۴-۱ و۶ : ایزوله های *S. epidermidis* دارای ژن *mec*A
ستون ۵: ایزوله *S. epidermidis* فاقد ژن *mec*A
ستون ۷: کنترل منفی= *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213
ستون ۸: کنترل مثبت = *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591
ستون ۹: سایز مارکر (1kb Ladder fermentase)

جدول۱: حسا سیت و ویژگی روش اگزا سیلین آگار اسکرینینگ با استفاده از ۳ رقت مختلف اگزاسیلین در مقایسه با PCR در شناسایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین

رقت اگزاسیلین	باکتری های دارای ژن *mec*A (تعداد:۸۹ ایزوله)		باکتری های فاقد ژن *mec*A (تعداد: ۱۱ ایزوله)		حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)
	مثبت واقعی	منفی کاذب	منفی واقعی	مثبت کاذب		
۰/ ۶µg/ml						
۲۴ساعت	۸۵	۴	۱۱	۰	۹۵/۵	۱۰۰
۴۸ ساعت	۸۹	۰	۱۱	۰	۱۰۰	۱۰۰
۴ µg/ml						
۲۴ساعت	۷۸	۱۱	۱۱	۰	۸۷/۶	۱۰۰
۴۸ ساعت	۸۹	۰	۱۱	۰	۱۰۰	۱۰۰
۶ µg/ml						
۲۴ ساعت	۶۷	۲۲	۱۱	۰	۷۵/۲	۱۰۰
۴۸ ساعت	۷۵	۱۴	۱۱	۰	۸۴/۲	۱۰۰

بحث:

میزان مقاومت به متی سیلین در بین استافیلوکوک ها روند افزایشی داشته است (۱۵). طی مطالعه ای که در فنلاند انجام شده میزان مقاومت به متی سیلین در بین *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از ۲۸٪ در سال ۱۹۸۳ به ۷۷٪ در سال ۱۹۹۴ افزایش یافته است (۲۶). شناسایی مقاومت به وسیله تست های فنوتیپی در بین استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی مشکل می باشد به دلیل اینکه این باکتری ها اکثرا هتروژن هستند و سطوح مختلفی از مقاومت به متی سیلین در بین این باکتری ها بیان می شود (۲۷،۱۸). با وجود اینکه چندین مطالعه شناسایی ژن *mecA* را به عنوان یک روش حساس جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک ها معرفی کرده اند، ولی این روش در اکثر آزمایشگاه های میکروبیولوژی عملی نیست و آزمایشگاه هایی که نمونه های زیادی دارند قادر به استفاده از این روش نمی باشند. بنابراین وجود یک تست فنوتیپی ساده، ارزان قیمت و سریع جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین ضروری می باشد. تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با رقت ۰/۶µg/ml اگزاسیلین در سال ۱۹۹۹ توسط Kohner بر مبنای ۱۰ برابر کاهش در breakpoint برای استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی پیشنهاد شد (۱۷). Row و Caierao نشان دادند که این رقت برای شناسایی مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* درمقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد (۷، ۲۸). در این مطالعه اگزاسیلین آگاراسکرینینگ بـا رقت ۰/۶µg/ ml و انکـوباسیون ۲۴و ۴۸ ساعته به ترتیب دارای حساسیت ۹۵/۵٪ و ویژگی ۱۰۰٪ بود. رقت ۴ µg/ml بر مبنای مطالعات انجام شده توسط Ferreria (۱۸) صورت گرفت که وی رقت های۱ µg/ ml ، ۲، ۴و ۶ را استفاده کرد و بیان نمود که رقت ۴µg/ml با انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین در بین استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی در مقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد. Caierao و همکاران (۷) نشان دادند که این رقت در شناسایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد. در این مطالعه اگزاسیلین آگار اسکرینینگ µg/ ml ۴ با انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب دارای حساسیت۸۷/۶٪ و ویژگی ۱۰۰٪ بود. تست با رقت µg/ml ۶ حساسیت کمی در شناسایی سویه های مقاوم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نشان داد. هر چند Ferreria نشان داد که رقت ۶µg/ml با انکوباسیون ۴۸ ساعته جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی دارای حساسیت ۹۴٪ می باشد (۱۸). در این مطالعه تعدادی از باکتـری هـا حتـی پس از گذشت ایـن زمـان نیـز نتـوانستند بر روی محیط حاوی µg/ ml ۶ رشد کنند. پلیت های حاوی µg/ml ۰/۶ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون کلنی های قابل رویتی دیده شد اما در مورد µg/ml ۴ و µg/ ml ۶ ، ۴۸ ساعت زمان نیاز بود تا کلنی های قابل رویت شوند. به منظور بررسی بالاترین حساسیت در این تست ۳ رقت مختلف از اگزاسیلین و ۲ دوره انکوباسیون استفاده شد و مشاهده گردید که تست با رقت µg/ml ۰/۶ و µg/ ml ۴ و انکوباسیون ۴۸ ساعت قادر به تشخیص صحیح سویه های حساس و مقاوم می باشد. با وجود حساس بودن تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ در تشخیص سویه های حساس و مقـاوم ایـن تست یک روش سریـع نمی باشد زیرا بعضی از باکتری های مقاوم ۲۴ ساعت اول کلنی های قابـل رویتی ایجـاد می کنند ولی تعداد کمی نیز وجود دارند که پس از گذشت ۴۸ ساعت کلنی ایجاد کرده و ۴۸ ساعت زمان نیاز است تا جواب منفی مشخص شود. از آنجایی که ۴۸ ساعت در وضعیت های خاص مثل سپتی سمی زمان زیادی است و این بیماران باید هرچه سریعتر تحت درمان قرار بگیرند. ولی نتیجه یک تست با ارزش ولی با تاخیر می تواند یک رژیم درمانی ارزان و با سمیت کمتر را پیشنهاد کند.

نتیجه گیری:

هر چند در این مطالعه اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با رقت ۶µg/ml حساسیت کمی را در شناسایی باکتری های مقاوم به متی سیلین نشـان داد ولـی بـه دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن، این تکنیک بـا رقت µg/ml ۰/۶ و µg/ml ۴ و انکوباسیون ۴۸ ساعت می تواند یک تست مفید و قابل اعتماد در تشخیص سویه های حساس و مقاوم به متی سیلین در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* باشد.

فهرست مراجع:

1. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(5): 1740-6.
2. Miragaia M, Couto I, Pereira SF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlov JO, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 2002; **40**(2): 430-8.
3. Mack D, Sabottke A, Dobinsky S, Rohed H, Horstkotte MA, Knobloch JK. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **46**(1): 178-83.
4. Li H, Xu L, Wang J, Wen Y, Vung C, Otto M, et al. Conversion of *Staphylococcus epidermidis* strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infect Immun* 2005; **73**(5): 3188-91.
5. Raad I, Alrahwan A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis* 1998; **26**(5): 1182-7.
6. De Giusti M, Pacifico L, Tufi D, Panero A, Boccia A, Chiesa C. Phenotypic detection of nosocomial mecA-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**(3): 351-8.
7. Caierao J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG, Azevedo PA. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci(CNS). *J Med Microbiol* 2004; **53**(12): 1195-9.
8. Finan JE, Rosato AE, Dickinson TM, Archer GL. Conversion of oxacillin-resistant staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression. Antimicrob Agents Chemother 2002; **46**(1): 24-30.
9. Chambers HF, Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**(4): 781-791.
10. Ramotar K, Bobrowska M, Jessamine P, Toye B. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci initially reported as methicillin susceptible using automated methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; **30**(4): 267-73.
11. Hussain Z, Stoakes L, Lannigan R, longo S, Nancekivell B. Evaluation of screening and commercial methods for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(1): 273-4.
12. Garret DO, Jochimsen E, Murfitt K, Hill B, McAllister S, Nelson P, et al. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; **20**(3): 167-70.
13. Ahanotu EN, Stone JH, McAllister SK, Miller JM, Ahearn DG. Vancomycin resistance among strains of *Staphylococcus epidermidis*: effects on adherence to silicone. *Curr Microbiol* 2001; **43**(2): 124-8(Abstract).
14. Sieradzki K, Roberts RB, Serur D, Hargrave J, Tomasz A. Heterogeneously vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* stain causing recurrent peritonitis in a dialysis patient during vancomycin therapy. *J Clin Microbiol* 1999; **37**(1): 39-44.
15. Louie L, Majury A, Goodfellow J, Louie M, Simor AE. Evaluation of latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(11): 4149-51.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard 6th edition. CLSI document M7-A7. Wayne, PA. 2006.
17. Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill F 3rd. Comparison of susceptibility testing methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus and coagulase-

negative Staphylococcus spp. *J Clin Microbiol* 1999**; 37**(9):2952-61.

18. Ferreria RB, Iorio NL, Malvar KL, Nunes AP, Fonseca LS, Bastos CC, et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(8): 3609-14.
19. Oliveria AD, d Azevedo PA, de Sousa LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg c, et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative staphylococcus isolated from ophthalmic infections. *Arq Bras Oftalmol* 2007; **70**(4): 667-75.
20. Mahon CR, Manuselis G. *Text book of Diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saundars Company. 2000; PP: 339-340.
21. York MK, Gibbs L, Chehab F, Brook GF. Comparison of PCR detection of mecA with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 1996; **34**(2): 249-53.
22. Kalia A, Rattan A, Chopra P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Anal Biochem* 1999; **275**(1):1-5.
23. Araj GF, Talhouk RS, Simaan CJ, Maasad MJ. Discrepancies between mecA PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, (1999); **11**(1):47-52.
24. Frebourg NB, Nouet D, Lemee L, Martin E, Lemeland JF. (1998). Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing mecA. *J Clin Microbiol*, **36**(1):52-7.
25. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning, a laboratory Manual*. 3th ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory press, 2001; PP: 8.4-8.5.
26. Martins A, Cunha Mde L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 2007; **51**(9): 787-95.
27. 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.
28. Row F, Vargas Superti S, Machado Scheibe R, Dias CG.Agar diffusion, agar dilution, E-test, and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci small star, filled. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **43**(1): 45-8.