فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پانزدهم، شماره ۲، صفحه ۱۰۰ - ۹۳ (تابستان ۱۳۹۱)

بررسی کارآمدی روش‌های دیسک دیفیوژن، آگاراسکرین و E-test در مقایسه با Real-time PCR برای تشخیص استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد ۱۳۸۷

لاله شریعتی[۱و۲]، مجید ولیدی[۲]، مانا شجاع‌پور[۱و۲]، علی‌محمد هاشمی‌نیا [۳]، محمدامین طباطبایی‌فر[۲و۴]، علی کریمی[۲]، محمدرضا نفیسی[۲*]

[۱] گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
[۳] گروه داخلی جراحی، دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
[۴] گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

Archive of SID

چکیده

زمینه: استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی (CoNS) یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی هستند. هدف از این مطالعه مقایسه کارآمدی روش‌های دیسک دیفیوژن، آگار اسکرین و E-test در مقایسه با وجود ژن *mecA* است که به‌روش Real-time PCR در ایزوله‌های کلینیکی استافیلوکوک کواگولاز منفی مقاومت به متی‌سیلین، به‌عنوان استاندارد طلایی تعیین شد.

مواد و روش‌ها: ۸۸ ایزوله استافیلوکوک کواگولاز منفی از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های آموزشی شهرکرد جدا شدند. با روش‌های دیسک دیفیوژن، آگار اسکرین، E-test سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شده و وجود ژن *mecA* به‌روش Real-time PCR تعیین گردید. مقایسه نتایج روش‌های انجام شده با نتایج Real-time PCR توسط آزمون کای مربع و آزمون دقیق فیشر انجام گردید.

یافته‌ها: از بین ۸۸ ایزوله استافیلوکوک کواگولاز منفی، ۴۶ مورد (۵۲/۳ درصد) حامل ژن *mecA* بودند و ۴۲ مورد (۴۷/۷ درصد) فاقد این ژن بودند. نتایج همه روش‌های استفاده شده ارتباط معنی‌داری با Real-time PCR نشان دادند. E-test دارای حساسیت، اختصاصیت ۱۰۰ درصد، اگزاسیلین آگار اسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب حساسیت و اختصاصیت ۹۶ درصد و ۹۸ درصد، حساسیت و اختصاصیت دیسک دیفیوژن به‌ترتیب ۹۱ درصد و ۹۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: بر طبق مطالعه حاضر، بهترین روش فنوتیپی E-test می‌باشد که استفاده از آن توصیه می‌گردد. در صورت وجود محدودیت‌های اقتصادی، روش آگاراسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) که در تشخیص مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های استافیلوکوک گوآگولاز منفی از نظر صحت و مقرون به‌صرفه بودن روش مناسبی می‌باشد، نیز قابل پیشنهاد است.

واژگان کلیدی: استافیلوکوک کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین، دیسک دیفیوژن، آگاراسکرین، E-test، ژن *mecA* real-time PCR

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۳۰- **پذیرش مقاله:** ۸۸/۱۱/۱۴

* شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

E-mail: mrnafisi@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از عوامل عمده‌ی عفونت‌های بیمارستانی، پاتوژن فرصت‌طلب بسیار مهم و عامل عفونت‌های جدی هستند (۱ و ۲).

افزایش تعداد بیماران دارای نقص ایمنی و کاربرد وسیع وسایل تهاجمی ایجاد عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها را بیشتر می‌کند. به‌علاوه مقاومت آنتی‌بیوتیکی مخصوصاً مقاومت به متی‌سیلین در گونه‌های این باکتری، همچون سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، رو به افزایش است.

از آنجا که درمان عفونت‌های ایجاد شده با این سویه‌ها به تجویز آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی توکسیک و گران قیمت نیازمند است، تشخیص سریع آنها اهمیت می‌یابد (۳).

مقاومت استافیلوکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با مکانیسم کسب پلاسمید حاوی ژن بتالاکتاماز و یا جهش‌های کروموزومی می‌باشد که مورد اخیر موجب تغییر در پروتئین‌های موجود در دیواره‌ی سلولی باکتری شده که به پروتئین‌های باند شونده به پنی‌سیلین معروفند (PBPs)(۴).

بیشترین علت مقاومت به اگزاسیلین در ارتباط با ژن mecA می‌باشد، ژنی که محصول آن یک پروتئین باند شونده به پنی‌سیلین تغییر یافته است (PBP2a یا PBP2´) و می‌تواند مقاومت هموژن یا هتروژن را بیان نماید. PBP2a تمایل پایینی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. مقاومت هموژن با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی تشخیص داده می‌شود این در حالی است که تشخیص مقاومت هتروژن با این روش‌ها بسیار مشکل است، زیرا تنها یک قسمت از جمعیت باکتری‌ها فنوتیپ مقاومت را بیان می‌کند و به‌عنوان مثال تنها یک سلول از میان ۱۰۰۰۰۰۰ سلول، می‌تواند مقاوم باشد (۵).

روش‌های فنوتیپی مختلف نظیر دیسک دیفیوژن[1] و آگاراسکرین[2] برای تشخیص مقاومت به متی‌سیلین در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی به‌کار می‌روند که البته نتایج حاصل از آنها مورد بحث می‌باشند. تشخیص *mecA* و یا محصول پروتئینی آن (PBP2a)، صحیح‌ترین روش برای تشخیص مقاومت به اگزاسیلین است و می‌توان از آن برای تأئید نتایج تست‌های فنوتیپی در تعیین حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوک جدا شده از عفونت‌های جدی استفاده کرد (۶).

هدف از این مطالعه، بررسی نتایج روش‌های دیسک دیفیوژن، آگار اسکرین و E-test در مقایسه با تعیین ژن *mecA* به‌روش Real-time PCR به‌عنوان استاندارد طلایی است تا کارآمدترین روش فنوتیپی تعیین مقاومت به اگزاسیلین در ایزوله‌های بالینی CoNS مشخص شود.

مواد و روش‌کار

از بین ۲۸۴ مورد استافیلوکوک که به‌طور تصادفی از نمونه‌های کلینیکی (زخم، خون، ادرار، CSF، کاتتر درون رگی و غیره) بیمارستان‌های آموزشی هاجر و کاشانی شهرکرد در سال ۱۳۸۷ جدا شدند، ۸۸ مورد کوکسی گرم مثبت با آرایش خوشه‌ای، تست کاتالاز مثبت، تست‌های کواگولاز و DNase منفی، استافیلوکوک کوآگولاز منفی (CoNS) تلقی شدند و در این تحقیق توصیفی- تحلیلی شرکت داده شدند.

برای تعیین فنوتیپی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین از

[1] Disk Diffusion
[2] Screen Agar

Archive of SID
www.SID.ir

روش‌های دیسک دیفیوژن، اگزاسیلین آگار اسکرین و E-test استفاده شد. بنابر توصیه‌های انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI)، از دیسک اگزاسیلین به جای متی‌سیلین استفاده شد که در شرایط آزمایشگاه پایدارتر است (۵). سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند از استافیلوکوک کواگولاز منفی به محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح شد و سپس دیسک اگزاسیلین (Himedia-India، ۱میکروگرم،) روی آن کاشته شد. پلیت را به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۵ ^{o}C انکوبه نموده و بعد از آن قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه گرفته شد (مقاوم: ۱۰mm≤، حد واسط: ۱۱-۱۲mm، حساس: ۱۳ mm≤).

در روش اگزاسیلین آگار اسکرین ابتدا استافیلوکوک کواگولاز منفی توسط سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی که معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند بود، نمونه‌برداری شد و به‌طور یکنواخت برروی محیط مولر هینتون آگار حاوی نمک و اگزاسیلین (۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزاسیلین +MHA+%4NaCl) کشت داده شد (Himedia-India) و ۲۴ ساعت در ۳۵ ^{o}C انکوبه گردید. سپس پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند، وجود حتی یک کلونی نشانه مقاومت است، در صورت عدم رشد و یا رشد تعداد کمی کلونی، مجدداً پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفته و نتایج نهایی ثبت شد (۷ و ۸).

برای تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) اگزاسیلین با روش E-test ابتدا توسط سواب استریل از سوسپانسیون باکتریایی استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی که معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند بود، نمونه‌برداری شده و به‌طور یکنواخت برروی محیط خاص تعیین MIC با متد E-test (MHA+0/85%NaCl) گسترش داده شد، سپس توسط پنس و با دقت و رعایت شرایط آسپتیک، یک استریپ E-test اگزاسیلین (AB BIODISK،Solna،Sweden) روی محیط قرار داده شد و پلیت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰-۱۶ ساعت قرار داده شد. در بررسی نتایج، عددی که مقابل انتهای هاله عدم رشد کنار استریپ بود به‌عنوان MIC با مقیاس میکروگرم بر میلی‌لیتر خوانده شد. (حساس: ۲≤، مقاوم:۴≥)

انجام Real-time PCR برای بررسی وجود ژن *mecA*

جهت استخراج DNA از کیت Romega Magnesil (امریکا) استفاده شد. وجود ژن *mecA* با تکنیک Taqman® Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرها و پروب استفاده شده به قرار زیر بود (۹):

mecA F	5´ GGCAATATTACCGCACCTCA 3´
mecA R	5´ GTCTGCCACTTTCTCCTTGT 3´
mecA Probe	5´AGATCTTATGCAAACTTAATTGGCAAATC 3´

رنگ Reporter استفاده شده در این پرایمرها و پروب‌ها Fam و 3´quencher آن TAMRA می‌باشد. واکنش PCR به‌حجم ۱۲/۵ میکرولیتر است. شامل: ۶/۲۵ میکرولیتر master mix (2x.Ampliqon-USA)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (10PM،Methabion–Germany)، ۰/۵ میکرولیتر پروب (5PM. Methabion-Germany)، ۱ میکرولیتر MgCl2(500mM.cinnagene-Iran)، ۱/۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲/۵ میکرولیتر DNA باکتری، سپس این مخلوط در دستگاه Real time rotary analyzer (Rotor- Gene 3000) با سیکل

Archive of SID

www.SID.ir

دمایی: ۳۰ ثانیه ۹۵°C (۳۰ سیکل) و ۱ دقیقه ۶۰°C قرار داده شد.

در این تحقیق از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن mecA و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 به‌عنوان کنترل منفی برای این ژن استفاده شد.

در انتها نتایج تست‌های مختلف با نتایج Real-time PCR مقایسه گردید. برای آنالیز نتایج از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc, chicago IL) ویرایش ۱۳ استفاده شد. حساسیت تست‌ها و معنی‌دار بودن روش‌ها با آزمون کای مربع و آزمون دقیق فیشر محاسبه شد. P.value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی نیز با استفاده از روابط آماری محاسبه شدند.

یافته‌ها

از بین ۸۸ ایزوله استافیلوکوکوس کواگولاز منفی، ۴۶ مورد جدول ۱ آورده شده است. همه روش‌های استفاده شده، ارتباط معنی‌داری با Real-time PCR نشان دادند.

اعتبار (Validity) نتایج برای تمام تست‌ها در جدول ۲ آورده شده است. نتایج تست‌های فنوتیپی در مقایسه با Real-time PCR به‌قرار زیر بود: روش E-test دارای حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی ۱۰۰ درصد، روش اگزاسیلین آگار اسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای حساسیت و اختصاصیت به‌ترتیب ۹۶ درصد و ۹۸ درصد و روش دیسک دیفیوژن دارای حساسیت و اختصاصیت به‌ترتیب ۹۱ درصد و ۹۰ درصد بود. در شناسایی موارد MRCoNS با آگار اسکرین، دو مورد نتیجه منفی کاذب و یک مورد مثبت کاذب و در مورد دیسک دیفیوژن چهار مورد نتیجه منفی کاذب و چهار مورد مثبت کاذب مشاهده گردید.

جدول ۱) نتایج روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت به متی‌سیلین و مقایسه آن با Real-time PCR

Real-time PCR در تشخیص ژن *mecA*	تعداد ایزوله‌ها	تعداد (٪) نتایج ایزوله‌ها در تست‌های مختلف					
		اگزاسیلین E-test*		اگزاسیلین سالت آگاز اسکرین		اگزاسیلین دیسک دیفیوژن	
		≥۴	≤۲	رشد	عدم رشد	مقاوم	حساس
مثبت	۴۶	۴۶	۰	۴۴	۲	۴۲	۴
منفی	۴۲	۰	۴۲	۱	۴۱	۴	۳۸

* MIC بر حسب (میکرگرم بر میلی‌لیتر)

جدول ۲) اعتبار روش‌های مختلف در تعیین مقاومت به اگزاسیلین (استاندارد طلائی در این تحقیق Real-time PCR

نوع تست	حساسیت (٪)	ویژگی (٪)	ارزش اخباری مثبت (٪)	ارزش اخباری منفی (٪)
E-test (اگزاسیلین)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
آگار اسکلرین ۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۹۶	۹۸	۹۸	۹۵
اگزاسیلین دیسک دیفیوژن	۹۱	۹۰	۹۱	۹۰

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین در آزمایشگاه به‌علت طبیعت ناهمگن (هتروژن) و همچنین وجود متغیرهای مؤثر در بیان ژن (مثل: محیط، میزان تلقیح، pH، دما و غلظت نمک) امری پیچیده می‌باشد (۱۰ و ۱۱). تنها تعداد کمی از سلول‌های جمعیت باکتری‌ها (به‌خصوص در CoNS) ممکن است به‌علت هتروژنیسیتی بیان ژن *mecA* از نظر PBP2 مثبت شوند. به‌علاوه، مقاومت نسبت به متی‌سیلین می‌تواند با مکانیسم‌های غیروابسته به PBP2 مثل تولید بسیار زیاد بتالاکتاماز به‌وجود آید (۱۲).

بنابر نتایج چندین مطالعه PCR روشی حساس و دقیقی برای شناسایی مقاومت به متی‌سیلین در CoNS می‌باشد (۱۳ و ۱۴) وReal-time PCR نسبت به PCR دارای سرعت بیشتری است (۹)، اما متأسفانه در اغلب آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شرایط انجام این روش‌ها وجود ندارد. لذا تمرکز بر روی روش‌های فنوتیپی به‌نظر منطقی می‌رسد، با وجودی که انستیتو استانداردهای آزمایشگاه کلینیکی (CLSI)، تست‌های فنوتیپی اگزاسیلین را برای تعیین مقاومت به پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلی‌ناز در گونه‌های باکتریائی CoNS، توصیه نمی‌کند، ما در این مطالعه، نظیر بسیاری دیگر از مطالعات، ارتباط معنی‌داری را بین نتایج روش‌های فنوتیپی انجام شده برای تعیین حساسیت به اگزاسیلین با نتایج Real-time PCR نشان دادیم، به‌طوری‌که نتایج E-test، ۱۰۰ درصد با حضور ژن *mecA* مطابق داشت. در مطالعه الیویرا (Oliveria) و همکاران، حساسیت روش E-test نسبت به PCR ۱۰۰ درصد اما ویژگی آن پایین‌تر بوده است (۴). لوئی (Louie) و همکاران (۱۵) هم اختصاصیت نسبتاً کمتری را برای E-test نسبت به نتایج ما گزارش کرده‌اند.

در تحقیق حاضر، اگزاسیلین آگار اسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب حساسیت و ویژگی ۹۶ و ۹۸ درصد داشت، در مطالعه الیویرا (Oliveira) و همکاران ویژگی این تست ۱۰۰ درصد بود، اما حساسیت آن (۹۱/۸ درصد) نسبت به مطالعه ما کمتر بوده است (۴) والت (Wallet) و همکاران و همچنین اسکولاس (Sakoulas) و همکاران در دو تحقیق مجزا نتایج آگار اسکرین و PCR را مقایسه کردند و به‌ترتیب حساسیتی برابر با ۹۹ و ۹۶ درصد گزارش کردند (۱۶ و ۱۷).

در بین روش‌های انجام شده در این تحقیق، کمترین میزان حساسیت و ویژگی در اگزاسیلین دیسک دیفیوژن مشاهده گردید. کلبرت (Kolbert) و همکاران نشان دادند که دیسک دیفیوژن در شناسائی دو سویه حامل *mecA* و ۱۳ سویه فاقد این ژن ناتوان است (۱۸) در مطالعه ما نیز با روش مزبور، ۴ سویه حامل ژن *mecA* و ۴ سویه فاقد این ژن جواب کاذب داشتند. فریرا (Ferreira) و همکاران، حساسیت و ویژگی دیسک دیفیوژن را به‌ترتیب ۹۴/۲ و ۹۱/۸ درصد اعلام کردند (۱۹) که تا حدودی از نتایج ما بالاتر می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر حسین (Hussain) و همکاران بیان کردند که تست دیسک دیفیوژن حساسیت بسیار پائینی دارد و تنها ۶۶ مورد از بین ۹۹ ایزوله حامل ژن *mecA* را می‌تواند شناسایی کند (۲۰) اگرچه در این مطالعه نیز همانند اکثر مطالعات دیگر نتایج دیسک دیفیوژن به لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری را با Real-time PCR نشان دادند و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیز به‌دلیل سهولت و مقرون به‌صرفه بودن معمول هستند، اما این تست برای تشخیص MRCoNS به‌قدر کافی قابل اعتماد نیست (۲۱).

Archive of SID

www.SID.ir

قضاوت در رابطه با اعتبار نتایج به‌دست آمده به‌دلیل خاصیت ناهمگنی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز، چندان ساده نیست؛ زیرا نتایج منفی کاذب در تست‌های ارزیابی شده ممکن است در ارتباط با بیان فراوان مقاومت ناهمگن باشد. از طرف دیگر نتایج مثبت کاذب ممکن است ناشی از تولید فراوان پنی‌سیلی‌ناز یا PBPs باشد (۲۲).

روش‌های روزمره در تشخیص ایزوله‌های MRCoNS زمان‌بر بوده و قابلیت اعتماد آنها بین ۹۹-۹۳ درصد گزارش شده است، در حالی‌که تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی *mecA* (به‌ویژه Real-time PCR) در تشخیص مقاومت به متی‌سیلین اختصاصی‌تر و سریع‌تر است اما گران‌تر می‌باشد (۲۳). نتایج تحقیق ما نشان داد که از بین روش‌های فنوتیپی انجام شده، نتایج E-test صددرصد با نتایج حاصل از روش ژنوتیپی Real-time PCR مشابه است، اما این روش پرهزینه بوده و مقرون به‌صرفه نمی‌باشد.

نتایج این تحقیق حاکی از آن است که اگزاسیلین آگار اسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص این سویه‌های مقاوم، کارآمد است و بنابراین می‌تواند یک روش جایگزین و مناسب محسوب شود. در همین راستا، بر طبق بیشتر مطالعات، حساسیت این تست بالا گزارش شده است (۲۴).

بر طبق مطالعه حاضر، بهترین روش فنوتیپی E-test می‌باشد که استفاده از آن برای تشخیص سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین توصیه می‌گردد. در صورت وجود محدودیت‌های اقتصادی، روش اگزاسیلین آگار اسکرین (۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌تواند پیشنهاد شود، زیرا نتایج این تست قابل اعتماد و تکرارپذیر است و به‌لحاظ هزینه نیز مقرون به‌صرفه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های صمیمانه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، گروه ایمنی‌شناسی و میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد قدردانی می‌نماییم.

References:

1.Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Vet Microbiol 2009; 134: 45-54.
2.Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis 1994; 19: 231-43.
3.Ieven M, Jansens H, Ursi D, et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by commercially available fluorescence test. J Clin Microbiol 1995; 33: 2183-5.
4.Oliveira AD, d'Azevedo PA, de Sousa LB, et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative Staphylococcus isolated from ophthalmic infections. Arq Bras oftalmol 2007; 70: 667-75.
5.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 9th ed. Wayne, PA: CLSI; 2006.
6.Sztramko R, Katz K, Antoniou T, et al. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in men who have sex with men: A case series. Can J Infect Dis Med Microbiol 2007; 18: 257-61.
7.Goetghebeur M, Landry PA, Han D, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A public health issue with economic consequences. Can J Infect Dis Med Microbiol 2007; 18: 27-34.
8.Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988; 1:

Archive of SID
www.SID.ir

173-86.
9.Shariati L, Mana Shojapour, Validi M, et al. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals. Iran South Med J (ISMJ) 2011; 14: 165-72.
10.Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, et al. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. J Clin Microbiol 1999; 37: 4051-8.
11.Simjee S, McDermott PF, White DG, et al. Antimicrobial susceptibility and distribution of antimicrobial-resistance genes among Enterococcus and coagulase-negative Staphylococcus isolates recovered from poultry litter. Avian Dis 2007; 51: 884-92.
12.Bush K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 109-23.
13.Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 2240-4.
14.Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA, et al. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 1994; 32: 1768-72.
15.Louie L, Majury A, Goodfellow J, et al. Evaluation of a latex agglutination test (MRSA-Screen) for detection of oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2001; 39: 4149-51.
16.Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 3946-51.
17.Wallet F, Roussel-Delvallez M, Courcol RJ. Choice of a routine method for detecting methicillin-resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother 1996; 37: 901-9.
18.Kolbert CP, Connolly JE, Lee MJ, et al.Detection of the Staphylococcal mecA gene by chemiluminescent DNA hybridization. J Clin Microbiol 1995; 33: 2179-82.
19.Ferreira RB, Iorio NL, Malvar KL, 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: 3609-14.
20.Hussain Z, Stoakes L, Lannigan R, et al. Evaluation of screening and commercial methods for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 1998; 36: 273-4.
21.Caierao J, Musskopf M, Superti S, et al. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (CNS). J Med Microbiol 2004; 53: 1195-9.
22.Schaefler S, Jones D, Perry W, et al. Emergence of gentamicin- and methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in New York City hospitals. J Clin Microbiol 1981; 13: 754-9.
23.Salisbury SM, Sabatini LM, Spiegel CA. Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay. Am J Clin Pathol 1997; 107: 368-73.
24.Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RL, et al. Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough?. Braz J Infect Dis 2007; 11: 415-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Comparison of the performance of Disk diffusion, Agar screening and E-test methods with Real-time PCR for the detection of methicillin resistant coagulase negative Staphylococcus strains isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2008

L. Shariati [1,2], M. Validi [2], M. Shojapour [1,2], AM. Hasheminia [3], MA. Tabatabaiefar [2,4], A. Karimi [2], MR. Nafisi [2]*

[1]Departmeny of Molecular Medicine, School of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
[2]Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN
[3]Department of Internal Medicine, School of Nursing, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN
[4]Department of Medical Genetics, School of Medicine, Jondishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, IRAN

(Received 20 Jan, 2010 Accepted 3 Feb, 2010)

Abstract

Background: Coagulase Negative staphylococci (CoNS) are nosocomial pathogens. The main objective of the study was to compare the performance of disk diffusion, E-test and agar screening methods with Real-time PCR technique for detection of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci (MRCoNS), using Taqman® Real-time PCR for *mecA* DVVHVVPHQWRGRORJLHV FRPSDULVRQDO

Methods: 88 coagulase negative Staphylococcus isolates were identified out of 284 Staphylococcus isolates collected from Hajar and Kashani hospitals-shahrekod, Iran. Methicillin resistance strains were identified by several methods: Disk diffusion, Agar screening, E-test and Real-time PCR. The results of the tested methods ZHUHFRP SDUHG ZLWK WKRVH RI WKH5 HDOWP H3&5 E\ &KLVTXDUHU) LWKH¶VH¸ LFWWW

Results: Of the 88 coagulase negative Staphylococcus isolates tested, 46 isolates (52.3%) were *mecA*-positive and 42 isolates (47.7%) were *mecA*-negative. The results of all the tested methods had a statistically significant agreement with those of Real-time PCR. The E-test was 100% sensitive and specific for *mecA* presence. The sensitivity and specificity of oxacillin agar screen (6.0 µg/ml) method were 96% and 98%, respectively and the sensitivity and specificity of oxacillin Disk diffusion method were 91% and 90%, respectively.

Conclusion: In the present study, E-test is proposed as the best phenotypic method. In case economic issue matters, the oxacillin agar screening method (6.0 µg/ml), which is suitable for the detection of MRCoNS due to its accuracy and low cost, is recommended.

Keywords: methicillin resistant coagulase negative staphylococcus, disk diffusion, agar screen, E-test, mecA gene, real- time PCR

*****Address for correspondence*: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, IRAN; E-mail: mrnafisi@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir