مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸ صفحات ۴۴- ۳۹

بررسی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از کشت خون با استفاده از دو روش اگزا سیلین دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره ای پلیمراز و حساسیت آنتی بیو تیکی آنها

سعید شجاع: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محمد رضا نهائی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
E-mail: nahaeimr@yahoo.com
مهرناز نهائی: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
صفر فرج نیا: گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
محمد آهنگر زاده رضایی: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سولماز نیک وش: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۶/۹/۲۹، **پذیرش**: ۸۷/۱/۳۱

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از شایعترین باکتریهای ایجاد کننده سپتی سمی در نوزادان و کودکان می باشد. مقاومت به متی سیلین در این گونه از استافیلوکوکهای کواگولاز منفی نیز همانند استافیلوکوکوس اورئوس مطرح بوده و این مقاومت از اهمیت بالینی برخوردار است. هدف این مطالعه، بررسی مقاومت به متی سیلین با استفاده از دو روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره ای پلیمر (PCR) و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از کشت خون بود.

روش بررسی: از کشت خون ۲۹۴۳ بیمار بستری در بیمارستان کودکان تبریز با علایم تب و سپتی سمی تعداد ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداسازی گردید. آزمایش تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن با استفاده ازدیسک اگزاسیلین ۱ میکروگرمی و ۹ آنتی بیوتیک دیگرطبق دستور العمل Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI انجام شد، همچنین باکتری های آزمایشی با استفاده از تکنیک PCR جهت جستجوی ژن *mecA* مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: حضور ژن *mecA* در ۸۹ ایزوله از ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شناسایی شد. و ۱۱ ایزوله فاقد این ژن بودند. دیسک اگزاسیلین ۸۵ ایزوله ی مقاوم را شناسایی کرد ولی ۵ ایزوله دارای ژن *mecA* را حساس و یک ایزوله ی فاقد این ژن را بصورت مقاوم نشان داد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر، حساسیت و ویژگی روش دیسک دیفیوژن برای شناسایی ایزوله های مقاوم به متی سیلین در مقایسه با PCR، بترتیب ۹۴/۴٪ و ۹۰/۹٪ بود. در بین آنتی بیوتیک های تست شده بیشترین مقاومت مربوط به پنی سیلین بود در حالی که تمام ایزوله های آزمایشی به وانکومایسین حساس بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن دارای حساسیت و اختصاصیت کمی در شناسایی سویه های مقاوم به متی سیلین می باشد. بنا بر این جهت تشخیص صحیح مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ترکیبی ازروشهای فنوتیپی و ژنوتیپی مورد نیاز می باشد.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، متی سیلین، اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، واکنش زنجیره ای پلیمراز، ژن *mec*A

مقدمه

استافیلوکوک های کواگولاز منفی مهمترین عامل عفونت های بیمارستانی، بویژه عفونت های خون می باشند. در استافیلوکوکهای کواگولاز منفی ۹۲-۷۴٪ موارد ازعفونت های خون در بیمارستانها توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس رخ می دهد (۱). بر اساس

مطالعات انجام شده در کشورهای غربی، بیش از ۷۰٪ از ایزوله های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به متی سیلین یا اگزاسیلین مقاومت دارند (۲). مهمترین مکانیسم مقاومت به متی سیلین تولید یک Penicillin Binding Protein, PBP تغییر شکل یافته می باشد که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام داشته و بوسیله ژن *mecA* کد می شود(۳). به دلیل اینکه عفونت با استافیلوکوکهای کواگولاز منفی در نوزادان نسبت به بقیه گروه های سنی بیشتر است، این مقاومت در بخشهای نوزادان مشکل بزرگی به نظر می رسد. از آنجایی که ایزوله های مقاوم به متی سیلین به اغلب آنتی بیوتیک های بتالاکتام نیز مقاومند، جهت درمان این عفونتها از گلیکوپپتید ها بویژه، وانکومایسین استفاده می شود (۶-۴). زمانی که این سویه ها به متی سیلین و دیگر پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز حساس هستند از این داروها به جای وانکومایسین استفاده می شود که از قدرت جذب خوبی در بدن برخوردار بوده و مشکلات بعد از درمان نیز کاهش می یابد(۷). به دلیل وجود گزارشهایی از موارد مقاوم به وانکومایسین در بین این باکتریها، تشخیص سریع و دقیق مقاومت به متی سیلین برای شروع یک دوره درمانی موثر مهم بوده و این امر می تواند مصرف غیرضروری وانکومایسین را کنترل کند(۱، ۸-۶، ۱۰، ۱۱). نگرانی در تشخیص مقاومت به متی سیلین این است که تست های حساسیت موجود قادر به شناسایی صحیح مقاومت به متی سیلین نباشند(۷). شناسایی مقاومت به متی سیلین شامل روشهای فنوتیپی و ژنوتیپی است (۱۲). امروزه در آزمایشگاه ها بیشتراز روشهای فنوتیپی مانند دیسک دیفیوژن استفاده می شود که عوامل مختلف محیطی بر رشد باکتری ها و نتایج آن مؤثر هستند(۱۳). با وجود اینکه نتایج چندین مطالعه نشان داده است که روش استاندارد دیسک دیفیوژن حساسیتی در حد شناسایی ژن *mecA* دارد(۱۶-۱۴) اما خطاهایی نیز به وسیله این روش گزارش شده است (۳، ۱۱، ۱۳، ۱۷) از این رو یک روش سریع، حساس و با دقت که تحت تاثیر شرایط محیط کشت نباشد، ضروری به نظر می رسد. جدا سازی ژن *mecA* یک مارکر مولکولی مفید برای شناسایی مقاومت به اگزاسیلین در استافیلوکوکوس ها بوده و می تواند مستقل از شرایط محیط کشت شناسایی شود. PCR یک تست سریع، حساس و با دقت برای جداسازی این ژن و در نتیجه مقاومت به متی سیلین می باشد (۴). در این مطالعه دو روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و PCR جهت جستجوی شناسایی مقاومت به متی سیلین استفاده شده و حساسیت و ویژگی دو روش مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن حساسیت باکتریهای مورد مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان، بررسی گردید.

مواد و روش ها

در فاصله زمانی ۱۱ ماه (از شهریور۸۵ ۱۳تا تیر۱۳۸۶) در بیمارستان کودکان تبریز از کشت خون ۲۹۴۳ بیمار با علائم تب و سپتی سمی تعداد ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جمع آوری شد. 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(۱۸). تمام سویه ها تا زمان استفاده در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول در دمای ۷۰ C°- نگهداری شدند(۷). برای انجام آزمایش های مورد نظر، باکتری های ذخیره شده از فریزر خارج، پس از ذوب در دمای اتاق، کشت لازم به عمل آمد و بالاخره پس ازحصول رشد برای انجام تستهای بعدی استفاده شد.

روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن بر اساس استانداردهای CLSI (۲۰۰۶) با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار بدون NaCl و دیسک اگزاسیلین (۱μg) انجام شد (۱۹). بدین صورت که یک سواب استریل را با سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند آغشته کرده و پس از گرفتن مایع اضافی بر روی محیط کشت داده شد، سپس دیسک اگزاسیلین (MAST Group Ltd, Merseyside, UK) را روی محیط قرار داده و پلیت در دمای ۳۳ C° درجه انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله توقف رشد اندازه گیری گردید. قطر هاله کمتر از ۱۷ mm به عنوان مقاوم و قطر هاله بیشتر از ۱۸mm به عنوان حساس در نظر گرفته شد(۱۹). استافیلوکوکوس اورئوس سویه ATCC ۲۹۲۱۳ به عنوان سویه حساس و سویه ATCC ۳۳۵۹۱ به عنوان سویه مقاوم استفاده شد.

سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک های مختلف با استفاده از روش دیسک دیفیوژن انجام گرفت و حساسیت ایزوله های جدا شده با استفاده از دیسک های پنی سیلین (۱۰U)، اریترومایسین(۱۵ gμ)، جنتامایسین (۱۰gμ)، تریمتوپریم سولفامتوکسازول (۲۵ gμ)، کلیندامایسین (۲gμ)، آمیکاسین(۳۰gμ)، سیپروفلوکساسین (۵gμ)، ریفامپین (۳۰gμ)، وانکومایسین (۳۰gμ) شرکت (MAST Group Ltd, Merseyside, UK و پاد تن طب) با روش استاندارد دیسک دیفیوژن و طبق راهنمای CLSI انجام شد(۱۹).

برای استخراج DNA، باکتری های آزمایشی در ۵ میلی لیتر از محیط LB(Luria Bertoni) کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷C° انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت حاوی سلولهای باکتری به مدت ۱۰دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژگردیده و رسوب در ۴۰۰ μl بافرTE ((pH 8.0 Tris EDTA 1mM, 10mM) حل گردید. مقدار۴۰ μl از سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪ و ۷μl پروتئینازK به منظور لیز کردن سلول های باکتری به میکروتیوب اضافه و به مدت یک شب در ۴۰C° انکوبه گردید. سپس ۸۰ μl (Cetyl Trimethyl Amonium Bromide, CTAB) در سدیم کلراید ۱ مولار و۱۰۰ μl سدیم کلراید ۵ مولار به میکرو تیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵C° انکوبه گردید. در مرحله بعد ۷۰۰μl کلروفرم به میکروتیوب اضافه کرده، به آرامی به هم زده و سپس به مدت ۸ دقیقه در دور ۱۱۰۰۰ سانتریفوژشد. فاز بالایی به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و ۰/۶حجم (۴۲۰μl)

از ایزو پروپانول به لوله اضافه کرده به مدت نیم ساعت در $-20^{\circ}C$ قرار داده و بعد از این مدت ۱۰دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ، پس از بیرون ریختن محلول روئی رسوب را با ml ۱ اتانول ۷۰٪ شستشو داده و بعد از بیرون ریختن الکل، رسوب ته لوله را خشک کرده، در µl ۵۰ از بافر TE حل و در $-20^{\circ}C$ نگهداری شد(۲۰).

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

(5_ʹGTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA –3ʹ)

Forward: *mec*A1

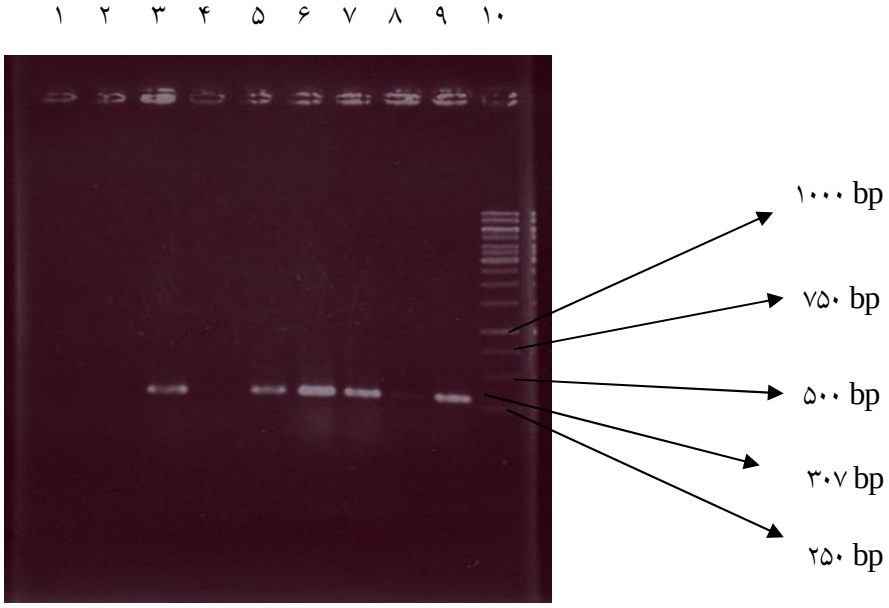
Reverse: *mec*A2 (5'_AATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3)

در واکنش وارد گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰pmol از هر پرایمر، ۲۰۰ µM از dNTP، ۱/۵mM $MgCl_2$، دو واحد از آنزیم Taq DNA polymerase بود. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در $94^{\circ}C$ برای ۴ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل: دناتوراسیون در $94^{\circ}C$ درجه برای ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در $60^{\circ}C$ برای ۴۵ ثانیه و تکثیر برای ۱ دقیقه انجام شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردیده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکیومنت بررسی گردید(۲۱). نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

در روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکو باسیون، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شده و طبق راهنمای CLSI بررسی گردید. در این روش ۸۵ ایزوله مقاوم و ۱۵ ایزوله نیز به صورت حساس شنا سائی شدند. نتایج حساسیت ایزوله های آزمایشی در مقابل آنتی بیوتیک های تست شده در جدول ۱ نمایش داده شده است. در روش PCR با استفاده از پرایمر های مربوطه ژن *mec*A تکثیر گردید که به صورت باند واضحی با طول ۳۰۷ جفت باز مشاهده شد. جهت اطمینان از صحت تست PCR در همه واکنشها از کنترل مثبت شامل DNA استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 واجد ژن *mec*A و کنترل منفی DNA استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۹۲۱۳ فاقد ژن *mec*A استفاده شد. از بین ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۸۹ مورد واجد ژن *mec*A بودند و ۱۱ مورد فاقد این ژن بودند(شکل ۱).

در مطالعه حاضر از روش PCR به عنوان استاندارد طلایی استفاده و نتایج روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن با PCR مقایسه شد که روش دیسک دیفیوژن ۵ ایزوله دارای ژن *mec*A را بصورت حساس و یک ایزوله فاقد ژن *mec*A را مقاوم شناسائی کرد. حساسیت و ویژگی روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR محاسبه گردید که این روش بترتیب دارای حساسیت۹۴/۴٪ و ویژگی ۹۰/۹٪ بود.



شکل ۱ : نتایج PCR تعدادی از باکتری های ایزوله شده
(ایزوله های تست شده در ستونهای ۱، ۲و ۴ بدون ژن *mec*A هستند.
ستونهای ۳ ، ۵، ۶و ۷ دارای ژن *mec*A هستند.)
ستون ۸ کنترل منفی (*S.aureus* ATCC 29213 فاقد ژن *mec*A)
ستون ۹ کنترل مثبت (*S.aureus* ATCC 33591 دارای ژن *mec*A))
ستون ۱۰ سایز مارکر

جدول۱: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم و حساس به متی سیلین

آنتی بیوتیک	تعداد(درصد) ایزوله های مقاوم به متی سیلین (تعداد:۸۹ ایزوله)		تعداد(درصد) ایزوله های حساس به متی سیلین (تعداد: ۱۱ایزوله)	
	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم
وانکومایسین	۸۹(۱۰۰)	(۰)	۱۱(۱۰۰)	(۰)
ریفامپین	۵۹(۶۶/۳)	۳۰(۳۳/۷)	۱۰(۹۰/۹)	۱(۹/۱)
سیپروفلوکساسین	۵۰(۵۶/۲)	۳۹(۴۳/۸)	۱۰(۹۰/۹)	۱(۹/۱)
آمیکاسین	۴۶(۵۱/۷)	۴۳(۴۸/۳)	۱۰(۹۰/۹)	۱(۹/۱)
کلیندامایسین	۴۲(۴۷/۲)	۴۷(۵۲/۸)	۹(۸۱/۸)	۲(۱۸/۲)
تریمتوپریم- سولفامتوکسازول	۳۷(۴۱/۶)	۵۲(۵۸/۴)	۷(۶۳/۶)	۴(۳۶/۴)
جنتامیسین	۲۴(۲۷)	۶۵(۷۳)	۱۰(۹۰/۹)	۱(۹/۱)
اریترومایسین	۱۳(۱۴/۶)	۷۶(۸۵/۴)	۷(۶۳/۶)	۴(۳۶/۴)
پنی سیلین	۱(۱/۱)	۸۸(۹۸)	۴(۳۶/۴)	۷(۶۳/۶)

بحث

شناسایی مقاومت به متی سیلین در بین استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی همواره به عنوان یک مشکل در آزمایشگاه های میکروبیولوژی بالینی مطرح بوده است(۷). علت این مشکل به دلیل هتروژن بودن این ارگانیسم ها می باشد(۳) یعنی با وجود اینکه هر ارگانیسم در جمعیت خاص ممکن است اطلاعات لازم برای مقاومت به متی سیلین را داشته باشد ولی تعداد کمی از سلولها می توانند واقعا ژن را بیان کنند. در حال حاضر آزمایشگاه های تشخیص پزشکی با اتکا به روشهای فنوتیپی به ویژه روش دیسک دیفیوژن اقدام به شناسایی استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین می نمایند که عوامل محیطی بر رشد باکتری ها و نتایج آنها موثر هستند. با وجود اینکه CLSI(۱۹) برای کاهش اثرات جانبی این عوامل و استاندارد کردن آنها دستور العمل هایی را تهیه و ارائه نموده اما درصدی از سویه های هتروژن با این روش تشخیص داده نشده و به طور کاذب بصورت حساس ظاهر می گردند در صورتیکه به طور بالقوه مقاومت بالایی نسبت به متی سیلین نشان می دهند که در درمان های نا موفق عفونتهای ناشی از سویه های هتروژن مقاوم به متی سیلین یا اگزاسیلین یا بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر به اثبات رسیده است(۱۳). میر صالحیان و همکاران(۱۳) در سال۱۳۸۲ تعداد ۶۲ سویه استافیلوکوک کواگولاز منفی را با PCR و دیسک دیفیوژن جهت جداسازی ارگانیسم های مقاوم به متی سیلین بررسی کردند و در مقایسه با PCR حساسیت دیسک دیفیوژن را ۹۶/۲۸٪ و ویژگی آن را ۹۵/۵۴٪ بدست آوردند. Hussainو همکاران در سال ۱۹۹۸نشان دادند (۱۱) که روش دیسک دیفیوژن تنها ۶۶ مورد از ۹۹ استافیلوکوکوس دارای ژن*mecA* را شناسایی کرد. Ferreria و همکاران(۳) در سال ۲۰۰۳ تعداد ۱۵۲ استافیلوکوکوس کواگولاز منفی را با PCR و دیسک دیفیوژن بررسی و برای دیسک دیفیوژن حساسیت ۹۴/۲٪ و ویژگی ۹۱/۸٪ بدست آوردند. Perazzi و همکاران(۱۷) در سال ۲۰۰۶ با مطالعه ۶۱ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با دیسک اگزاسیلین و روش PCR، برای دیسک اگزاسیلین حساسیت ۸۸٪ و ویژگی ۸۵٪ را پیشنهاد دادند. در مطالعه حاضر ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفتند و روش PCR جهت تجسس ژن*mecA* در همه آنها انجام شده و با نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن مقایسه گردید. در روش دیسک دیفیوژن ۸۵ ایزوله مقاوم به متی سیلین بودند در حالی که با روش PCR ۸۹ مورد از ایزوله های آزمایشی واجد ژن*mecA* بودند. بر اساس یافته های مطالعه حاضر روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک اگزاسیلین در شناسایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارای حساسیت ۹۴/۴٪ و ویژگی ۹۰/۹٪ می باشد. در روش دیسک دیفیوژن ۵ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که ژن*mecA* را داشتند به صورت حساس شناسایی شدند. Ferreria و همکاران(۳) در سال ۲۰۰۳ طی مطالعه ای ۶ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را که حاوی ژن*mecA* بودند با روش دیسک دیفیوژن به عنوان حساس جداسازی کردند و اینگونه بیان نمودند که این حالت به دلیل هتروژن بودن سویه ها در بیان ژن*mecA* بوده است و ژن*mecA* در این سویه ها بیان نشده است(۳). در مطالعه حاضر یک ایزوله از ۱۰۰ ایزوله مورد مطالعه در روش دیسک دیفیوژن مقاوم به متی سیلین و در روش PCR حساس بود. Kolbert(۲۲) موارد مشابهی را مشاهده نمود که استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی با وجود نداشتن ژن *mecA* به متی سیلین مقاومت نشان دادند. وی دلیل این امر را تولید بتالاکتاماز فراوان در این سویه ها بیان کرد (۲۲). در این مطالعه روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR دارای حساسیت۹۴/۴٪ و ویژگی ۹۰/۹٪ بود که نشان دهنده حساسیت و ویژگی پائین این روش نسبت به روش PCR می باشد. میزان مقاومت نسبت به متی سیلین در بین استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس متنوع گزارش شده است ۸۷/۱ ٪ سال۲۰۰۱ در آرژانتین (۲۳) ، ۷۹/۴٪ سال۲۰۰۳ در برزیل (۳)، ۷۰/۸٪ سال۲۰۰۴ در برزیل (۲۴). درمطالعات ذکر شده از روشهای مختلفی نظیر اگزاسیلین آگار اسکرینینگ، اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، agar dilution، E-Test و PCR استفاده شده است. در بین آنتی بیوتیکهای تست شده بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین بود.

Arciola و همکاران(۱۳) میزان مقاومت به پنی سیلین را در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۸۰/۷٪ گزارش نمودند(۲۵). در مطالعه ای که توسط Bogado و همکاران(۲۳) بر روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین انجام شد، درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف به شرح زیر بود: وانکومایسین(۰)، جنتامایسین(۶۷/۲)، اریترومایسین(۳۲/۷)، تریمتوپریم- سولفامتوکسازول(۳۷/۷) و کلیندامایسین (۲۹/۵)(۲۳). در مطالعه حاضر میزان مقاومت به وانکومایسین و جنتامایسین تقریبا شبیه به مطالعه ذکر شده می باشد. با وجودی که گزارشهایی از مقاومت به وانکومایسین در بین استافیلوکوکوس اپیدر میدیس وجود دارد در این مطالعه هیچ مقاومتی در بین باکتری های تست شده دیده نشد. میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین و تریمتوپریم سولفامتوکسازول در بین باکتری های تست شده بیشتر از مطالعه انجام شده توسط Bogado می باشد ولی این میزان با نتایجی که Koksalو همکاران در سال ۲۰۰۷ برای استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی مقاوم به متی سیلین گزارش نمودند شباهت دارد که وی مقاومت به اریترومایسین را ۸۰٪ و تریمتوپریم-سولفا متوکسازول را ۶۸/۴٪ گزارش نمود(۲۶،۲۳). در بین ایزوله های تست شده میزان مقاومت به کلیندامایسین ۵۲/۸٪ بود که بالاتر از مطالعه ای است که توسط Bogado (۲۹/۵٪) برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین و کمتر از میزانی است که توسط Koksal (۷۲٪) برای استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی مقاوم به متی سیلین گزارش نمود(۲۶،۲۳). در مورد ریفامپین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین منحصرا مطالعه ای برروی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین صورت نگرفته ولی بدون در نظر گرفتن مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نسبت به سیپروفلوکساسین ۲۵/۷٪، آمیکاسین۳۱/۹٪ و ریفامپین ۱۱٪ مقاومت گزارش شده است (۲۷،۲۵). ایزوله های حساس به متی سیلین به آنتی بیوتیک های روتین نیز حساسیت داشتند و مقاومت کمتری نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان دادند در صورتی که مقاومت چند داروئی در بین ایزوله های مقاوم به متی سیلین دیده شد. کمترین میزان مقاومت بعد از وانکومایسین نسبت به ریفامپین بود. با استفاده از مطالعات آزمایشگاهی و مدل های حیوانی نشان داده شده است که فعالیت ضد استافیلوکوکی ریفامپین از دیگر آنتی بیوتیک های تست شده، نظیروانکومایسین بیشتر است. ریفامپین در ترکیب با گلیکوپپتیدها فعالیت این آنتی بیوتیک ها را در برابر بیوفیلم های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بهبود می بخشد. حتی کاتتر هایی که با ریفامپین آغشته هستند نسبت به کلونیزاسیون با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، مقاوم می باشند(۵، ۳۰-۲۸).

نتیجه گیری

اگر چه تکنیک PCR، در اغلب آزمایشگاهها قابل انجام می باشد، ولی به دلیل هزینه بالا، نیازهای تکنیکی خاص یا عدم توجه به اهمیت موضوع، آزمایشگاهها به طور عملی به استفاده از این روش مبادرت نمی کنند و تست های فنوتیپی نظیر دیسک دیفیوژن برای استفاده روتین در آزمایشگاه ها به عنوان یک تست انتخابی و غربالی باقی مانده است. در حالیکه جهت تشخیص دقیق مقاومت در بین این باکتری ها و سویه های مهم بالینی، نیاز به ترکیبی از روشهای فنوتیپی و ژنوتیپی بوده و نمی توان صرفا به روشهای فنوتیپی در شناسایی ایزوله های مهم اکتفا نمود.

تقدیر و تشکر

از خانم دکتر مهرانگیز ابراهیمی ممقانی برای انجام آنالیزهای آماری، ازآقای محمد اکبری دیباور کارشناس ارشد میکروب شناسی وآقای امیر پیمانی دانشجوی دکترای باکتریولوژی پزشکی گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده پزشکی تبریز به خاطر نگهداری باکتری ها و کمک های تکنیکی تشکر و سپاسگزاری می شود.

References

1. 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.
2. Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: role of mecA transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**(6): 1616-23.
3. 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 Microbial* 2003; **41**(8): 3609-14.
4. De Giusti M, Pacifico L, Tufi D, Panero A, Boccia A, Chiesa C. Phenotypic detection of nosocomial *mec*A-positive coagulase-negative staphylococci from neonates. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**(3): 351-8.
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. 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.
7. 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.
8. Sechi LA, Pinna A, Pusceddu C, Fadda G, Carta F, Zanetti S. Molecular characterization and antibiotic susceptibilities of ocular isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 1999; **37**(9): 3031-3.
9. 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).
10. 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.
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. 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.
13. Mirsalehian A, Jabalameli F, Alizadeh S. Comparison of disk agar diffusion susceptibility testing and PCR in detection of methicillin resistant Staphylococcs aureus. *Med J Tehran Univ Med Sc* 2003; 61(6): 420-425 (Persian).
14. Hedin G, Lofdahl S. Detecting methicillin- resistant *Staphylococcus epidermidis*- disc diffusion, broth breakpoint or polymerase chain reaction. *APMIS* 1993; **101**(4): 311-8 (Abstract).
15. Olsson-Liljequist B, Larsson P, Ringertz S, Lofdahl S. Use of a DNA hybridization method to verify results of screening for methicillin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; **12**(7): 527-33(Abstract).
16. McDonald CL, Maher WE, Fass RJ. Revised interpretation of oxacillin MICs for *Staphylococcus epidermidis* based on mecA detection. *Antimicrob Agents Chemothe* 1995; **39**(4): 982-4.
17. Perrazi B, Fermepin MR, Malimovka A, Garcia SD, Orgambide M, Vay CA, et al. accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mrdiated by penicillin-binding protein 2a in coagulase negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(10): 3634-9.
18. Mahon CR, Manuselis G. *Text book of Diagnostic microbiology*. 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saundars Company. 2000; PP: 339-340.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement. CLSI document M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2006.
20. 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.
21. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning, a laboratory Manual*. 3th ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory press, 2001; PP: 8.4-8.5.
22. Kolbert CP, Connolly JE, Lee MJ, Persing DH. Detection of Staphylococcal *mec*A gene by chemiluminescent DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(8): 2179-82.
23. Bogado I, Sutich E, Krapp A, Marchiaro P, Marzi M, Putero J, Carrillo N. Methicillin resistance study in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci and determination of their susceptibility to alternative antimicrobial agents. *J Appl Microbiol* 2001; **91**(2): 344-50.
24. Caierao j, Musskopf M, Superti S, Roesch e, Dias CG, d Azevedo PA. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci(CNS). *J Med Microbiol* 2004; **53**(12): 1195-9.
25. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, et al. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterial*s 2005; **26**(33): 6530-5.
26. Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patient in Turkey. *Microbiol Res.* 2007; **21**(2):123-7.
27. Saginur R, Stdnis m, Ferris W, Aaron SD, Chan F, Lee C, Ramotar K. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob agents Chemother* 2006; **50**(1): 55-61.
28. Pascual A, Ramirez de Arellano E, Perea EJ. Activity of glycopeptides in combination with amikacin or rifampin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms on plastic catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**(6): 515-7(Abstract).
29. Peck KR, Kim SW, Jung SI, Kim YS, Oh WS, Lee JY, et al. Antimicrobial as potential adjunctive agents in the treatment of biofilm infection with *Staphylococcus epidermidis*. *Chemotherapy* 2003; **49**(4): 189-93(Abstract).
30. Allori MC, Jure MA, Romero C, de Castillo ME. Antimicrobial resistance and production of biofilms in clinical isolates of coagulase-negative Staphylococcus strain. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**(8): 1592-6