

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۱۳-۲۰

## مقایسه 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<sup>۱</sup>، محمد رضا نهائی\*<sup>۱،۲</sup>، صفر فرج نیا<sup>۳</sup>، محمد آهنگر زاده رضایی<sup>۱</sup>، سولماز نیک وش<sup>۴</sup>

۱) گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲) مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، 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 میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

nahaeimr@yahoo.com

تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱

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

### چکیده:

**زمینه و اهداف:** در سال های اخیر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین نقش فزاینده ای را در عفونت های خون نوزادان و کودکان داشته است. تشخیص صحیح مقاومت در این باکتری ها جهت درمان این بیماران ضروری است. هدف از این مطالعه ارزیابی ارزش تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با ۳ رقت مختلف اگزاسیلین و مقایسه آنها با نتایج PCR در شناسایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین بود.

**روش بررسی:** بر روی ۱۰۰ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از کشت خون نوزادان و کودکان تست تعیین حساسیت با استفاده از اگزاسیلین آگار اسکرینینگ حاوی رقت های ۰/۶ μg/ml، ۴ μg/ml و ۶ μg/ml انجام شد. ضمناً تمامی نمونه ها با روش PCR جهت جستجوی ژن *mecA* بررسی شدند.

**یافته ها:** با روش PCR در ۸۹ سویه آزمایشی ژن *mecA* شناسایی شد، اگزاسیلین آگار اسکرینینگ حاوی ۰/۶ μg/ml در مدت 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 و ۸۹ سویه مقاوم 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 حساسیت و ویژگی معادل PCR بود در صورتی که رقت ۶ μg/ml حساسیت کمی در جداسازی این سویه ها نشان داد. بنابراین تست اگزاسیلین آگار 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 یک تست مناسب جهت تشخیص سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین می باشد.

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

## مقدمه:

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) برای شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک ها شامل: تعیین MIC در محیط کشت جامد یا مایع، آگار اسکرینینگ و دیسک آگار دیفیوژن می باشد (۱۶). با وجود اینکه CLSI تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ را فقط برای شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس توصیه کرده است (۱۶)، برخی از محققین گزارش هایی مبنی بر کاربرد تست اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با استفاده از رقت های کمتر اگزاسیلین به عنوان یک تست حساس در شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک های کوآگولاز منفی منتشر نموده اند (۷، ۱۹-۱۷). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با استفاده از رقت های  $0.6 \mu\text{g/ml}$ ،  $4 \mu\text{g/ml}$  و  $6 \mu\text{g/ml}$  اگزاسیلین و مقایسه نتایج آن با PCR در شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود.

## مواد و روش ها:

در فاصله زمانی ۱۱ ماه (از شهریور ۱۳۸۵ تا تیر ۱۳۸۶) در بیمارستان کودکان تبریز از کشت خون ۲۹۴۳ بیمار با علائم تب و سبتي سمی تعداد ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس 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 کوآگولاز لوله و لام، مقاومت به باستیراسین و حساسیت به نوبیوسین تعیین هويت شدند (۲۰). تمام ایزوله ها تا زمان استفاده در محیط کشت تریپتی کیس سوی براث حاوی ۲۰٪ گلیسرول در  $70^{\circ}\text{C}$  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 قرار گرفتند.

## روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ:

در این روش به محیط کشت مولر هیتون آگار مقدار ۴٪ نمک (NaCl) اضافه شده و پلیت حاوی رقت های  $0.6 \mu\text{g/ml}$ ،  $4 \mu\text{g/ml}$  و  $6 \mu\text{g/ml}$  اگزاسیلین تهیه شد. سپس از هر ایزوله 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 سوآپ 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

در سال های اخیر استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی به ویژه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نقش فزاینده ای را در عفونت های بیمارستانی دارد. این باکتری عامل عفونت کاتترهای درون رگی و عفونت خون بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه نوزادان 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 مواجهه با این باکتری مقاومت آنتی بیوتیکی آن می باشد به طوری که حدود ۹۰٪ ایزوله های بیمارستانی این باکتری به متی سیلین مقاومند (۳)، و این سویه های مقاوم به متی سیلین علاوه بر اینکه به تمام داروهای بتالاکتام مقاومت دارند (۵) اغلب به دیگر مواد ضد میکروبی نظیر فلورو کینولون ها، آمینو گلیکوزید ها، تتراسیکلین، ماکرولید ها و تری متوپریم سولفا متوکسازول نیز مقاومند (۶). مکانیسم عمده مقاومت به متی سیلین تولید یک PBP (Penicillin Binding Protein) تغییر یافته به نام PBP2a می باشد که تمایل کمی را برای اتصال به داروهای بتالاکتام داشته و توسط این داروها مهار نمی گردد (۷، ۸). یک قطعه اضافی از DNA کروموزومی با طول تقریبی ۵۰-۳۰ کیلو باز به نام *mec* در استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین وجود دارد که هیچ آلل مشابهی از آن در استافیلوکوکوس های حساس به متی سیلین موجود نیست. *mecA* که ژن ساختمانی برای تولید PBP2a است درون قسمت *mec* قرار دارد (۹). درمان استافیلوکوکوس های حساس به متی سیلین با استفاده از پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز انجام می پذیرد (۱۰). در صورتیکه درمان سویه های مقاوم به متی سیلین با استفاده از وانکومایسین می باشد (۱۱). با این وجود هنوز پزشکان به دلیل اینکه از صحت تست های شناسایی مقاومت به متی سیلین مطمئن نیستند اغلب عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس های حساس به متی سیلین را با وانکومایسین درمان می کنند (۱۰). نظر به وجود گزارش هایی از موارد مقاومت به وانکومایسین در بین این باکتری ها (۱۴-۱۲)، یک روش مناسب جهت شناسایی سریع 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). شناسایی ژن *mecA* بوسیله PCR روش استاندارد طلائی جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس ها می باشد (۷). روش های توصیه شده توسط

، دو واحد از آنزیم Taq DNA polymerase بود. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$  برای ۴ دقیقه و به دنبال آن سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در  $60^{\circ}\text{C}$  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 داکيومنت 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 آگراسیلین آگار اسکرینینگ در مقایسه با PCR از آزمون کای دو استفاده گردید.

#### یافته ها:

نتایج روش آگراسیلین 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 جدول ۱ نشان داده شده است.

در روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *mecA* تکثیر گردید که به صورت باند واضحی با طول ۳۰۷ 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 *mecA*) و کنترل منفی DNA/استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 (حساس به متی سیلین و فاقد ژن *mecA*) استفاده شد. از بین ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد مطالعه ۸۹ مورد واجد ژن *mecA* و ۱۱ مورد فاقد این ژن بودند (شکل ۳). حساسیت و ویژگی روش آگراسیلین آگار اسکرینینگ در مقایسه با PCR تعیین شده و در جدول ۱ نشان داده شده است.

قسمت دیگر پلیت باکتری ها را به صورت خطی کشت داده، پلیت ها در دمای  $33^{\circ}\text{C}$  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 (شکل ۱). 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 (شکل ۲).

#### استخراج DNA:

باکتری های آزمایشی در ۵ میلی لیتر از محیط (Loria Bertoni) LB کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت حاوی سلول های باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ گردیده و رسوب در  $400\ \mu\text{l}$  بافر TE (Tris 10mM, EDTA 1mM (pH 8.0)) حل گردید. مقدار  $40\ \mu\text{l}$  از سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱٪ و  $7\ \mu\text{l}$  پروتئینازK با غلظت  $20\ \mu\text{g/ml}$  به منظور لیز کردن سلول های باکتری به میکروتیوب اضافه و به مدت یک شب در  $40^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. سپس  $80\ \mu\text{l}$  CTAB (Cetyl Trimethyl Amonium Bromide) در سدیم کلراید ۱ مولار و  $100\ \mu\text{l}$  سدیم کلراید ۵ مولار به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در  $65^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. در مرحله بعد  $700\ \mu\text{l}$  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  $1/6$  حجم ( $420\ \mu\text{l}$ ) از ایزو پروپانول به لوله اضافه و به مدت نیم ساعت در  $20^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از آن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و پس از بیرون ریختن محلول روئی، رسوب با ۱ ml اتانول ۷۰٪ شستشو داده و نهایتاً رسوب پس از خشک شدن در  $50\ \mu\text{l}$  از بافر TE حل گردیده و غلظت DNA با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین و در  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد (۲۲).

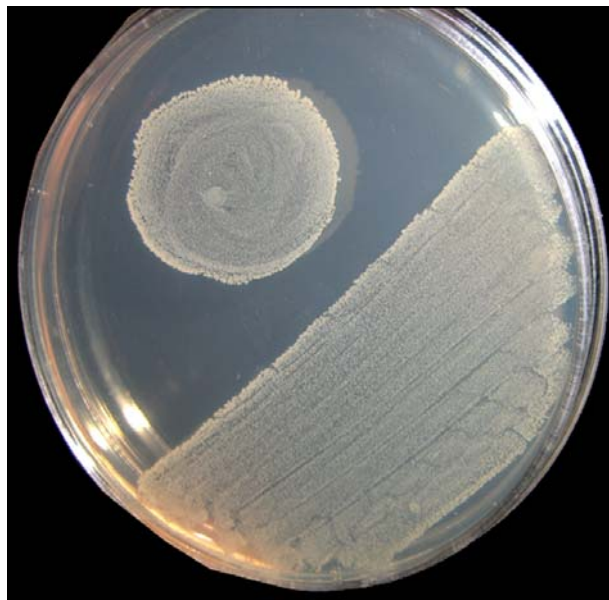
#### PCR:

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

F:*mecA*1 (5'-GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA-3')  
R:*mecA*2 (5'\_AATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3')

در واکنش RPC وارد گردید (۲۳، ۲۴). مخلوط واکنش شامل  $10\ \mu\text{mol}$  از هر پرایمر،  $200\ \mu\text{M}$  از dNTP،  $1.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$

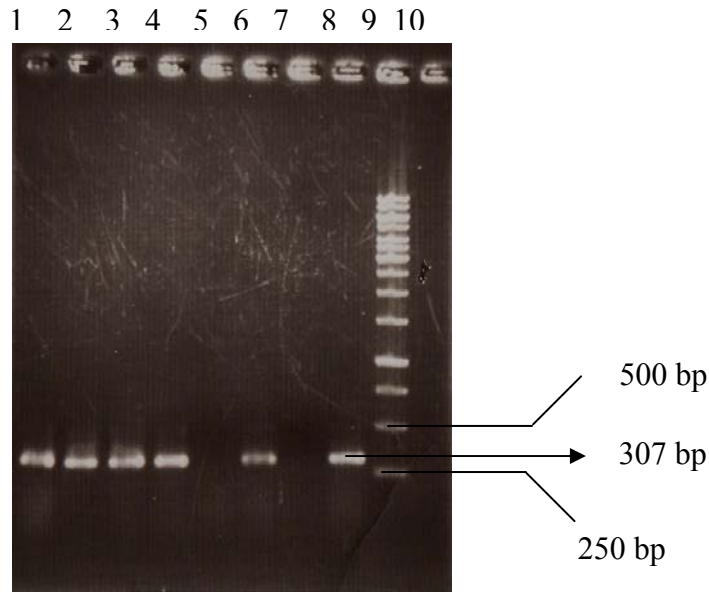
شکل ۱: نتیجه مثبت باکتری های آزمایش شده (مقاومت به متی سیلین) در روش اگزاسیلین آگار اسکرینینگ



شکل ۲: نتایج حاصل از تست سویه های استاندارد/ستافیلوکوکوس اورئوس در پلیت های حاوی ۰/۶  $\mu\text{g/ml}$  ، ۴  $\mu\text{g/ml}$  ، ۶  $\mu\text{g/ml}$  اگزاسیلین



شکل ۳: نتایج PCR در شناسایی ژن *mecA* در ۶ ایزوله *S. epidermidis* مورد مطالعه



ستون های: ۱-۴ و ۶: ایزوله های *S. epidermidis* دارای ژن *mecA*  
 ستون ۵: ایزوله *S. epidermidis* فاقد ژن *mecA*  
 ستون ۷: کنترل منفی = استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213  
 ستون ۸: کنترل مثبت = استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591  
 ستون ۹: سایز مارکر ( 1kb Ladder fermentase )

جدول ۱: حساسیت و ویژگی روش آگزا سیلین آگار اسکرینینگ با استفاده از ۳ رقت مختلف آگزا سیلین در مقایسه با PCR در

شناسایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین

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

**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/پیدرمیدیس 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 کوآگولاز منفی مشکل می باشد به دلیل اینکه این باکتری ها اکثراً 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 ۰/۶ μg/ml اگزاسیلین در سال ۱۹۹۹ توسط Kohner بر مبنای ۱۰ برابر کاهش در breakpoint برای استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی پیشنهاد شد (۱۷). Caierao و Row نشان دادند که این رقت برای شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس در مقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد (۷، ۲۸). در این مطالعه اگزاسیلین آگار اسکرینینگ با رقت ۰/۶ μg/ml و انکوباسیون ۲۴ و 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 های ۱، ۲، ۴ و ۶ را استفاده کرد و بیان نمود که رقت ۴ μg/ml با انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت جهت شناسایی مقاومت به متی سیلین در بین استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی در مقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد. Caierao و همکاران (۷) نشان دادند که این رقت در شناسایی استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ می باشد. در این مطالعه اگزاسیلین آگار اسکرینینگ ۴ μg/ml با انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب دارای حساسیت ۸۷/۶٪ و ویژگی ۱۰۰٪ بود. تست با رقت ۶ μg/ml حساسیت کمی در شناسایی سویه های مقاوم استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس نشان داد. هر چند Ferreria نشان داد که رقت ۶ μg/ml با انکوباسیون ۴۸ ساعته جهت

شناسایی مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی دارای حساسیت ۹۴٪ می باشد (۱۸). در این مطالعه تعدادی از باکتری ها حتی پس از گذشت این زمان نیز نتوانستند بر روی محیط حاوی ۶ μg/ml رشد کنند. پلیت های حاوی ۰/۶ μg/ml پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون کلنی های قابل رویتی دیده شد اما در مورد ۴ μg/ml و ۶ μg/ml، 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 ۰/۶ μg/ml و ۴ μg/ml 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 مقاوم این تست یک روش سریع نمی باشد زیرا بعضی از باکتری های مقاوم ۲۴ ساعت اول کلنی های قابل رویتی ایجاد 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 سستی 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 ۶ μg/ml حساسیت کمی را در شناسایی باکتری های مقاوم به متی سیلین نشان داد ولی به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن، این تکنیک با رقت ۰/۶ μg/ml و ۴ μg/ml و انکوباسیون ۴۸ ساعت می تواند یک تست مفید و قابل اعتماد در تشخیص سویه های حساس و مقاوم به متی سیلین در استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس 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, Alrahan 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, Ingo 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* strain 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 6<sup>th</sup> 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. Saunders 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.