EVALUATION OF A CHROMOGENIC MEDIUM FOR DIRECT DETECTION OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) FROM SURVEILLANCE NASAL SWAB SPECIMENS

THESIS

Submitted For Partial Fulfillment of Master Degree
In **Clinical and Chemical Pathology**

By
OSAMA AHMED MOHAMMAD SOLTAN
M.B., B.Ch.

Supervised by

Professor/Hadia Hussein Bassim
Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine-Ain Shams University

Professor/ Manal Abd El Alim Abd El Sattar
Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine-Ain Shams University

Doctor/Hala Mahmoud Hafez
Lecturer of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine – Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams Univeristy
2009

تقييم الوسط الملون للكشف المباشر عن البكتريا المكورة العنقودية المقاومة لعقار المثيسيللين في العينات المسحية المأخوذة من الأنف

رسالة
توطئة للحصول على درجة الماجيستير **فى الباثولوجيا الاكلينيكية و الكيميائية**

مقدمة من
طبيب / أسامة أحمد سلطان
بكالوريوس الطب والجراحة - كلية الطب – جامعة عين شمس

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور / هادية حسين بسيم
أستاذ الباثولوجيا الاكلينيكية و الكيميائية
كلية الطب – جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور / منال عبد العليم عبد الستار
أستاذ الباثولوجيا الاكلينيكية و الكيميائية
كلية الطب – جامعة عين شمس

الدكتور / هالة محمود حافظ
مدرس الباثولوجيا الاكلينيكية و الكيميائية
كلية الطب – جامعة عين شمس

كلية الطب - جامعة عين شمس
٢٠٠٩

الملخص العربى

مقدمة:

يعتبر عقار المثيسيللين اول عقار من مجموعة عقارات البينسيللين الذى يستخدم فى الكشف عن مقاومة الميكروب المكور العنقودى لهذه المجموعة من العقارات. وقد إستخدم هذا العقار في الكشف عن سلالات هذا الميكروب المنتجة لانزيم البينسيلليناز الذى يتسبب فى مقاومة هذا الميكروب لهذه العقاقير. إلا أنه منذ بداية عام ١٩٧٠ ظهرت سلالات من الميكروب المكور العنقودى مقاومة لكثير من المضادات الحيوية مثل عقار المثيسيللين و الجينتاميسين وتسبب انتشار هذه السلالات فى كثير من وبائيات عدوى المستشفيات على مستوى العالم.

منذ ذلك الحين، أصبح الميكروب المكور العنقودى المقاوم لعقارالمثيسيللين أحد أهم أسباب العدوى فى المستشفيات و وحدات الرعاية المركزة على مستوى العالم. وفى الاونة الأخيرة، أصبح هذا الميكروب السبب الاول لعدوى المستشفيات فى الولايات المتحدة الامريكية و المسبب لاكثر من ٦٣% من عدوى المستشفيات فى مصر كما ظهرت سلالات شرسة من هذا الميكروب مسببة لأمراض معدية فتاكة فى أناس أصحاء و فى سن صغيرة فى المجتمع .

على الرغم من ان معظم سلالات هذا الميكروب تفرز إنزيم البيتالاكتاميز، إلا أن هذا الانزيم ليس المسئول عن مقاومة هذه الميكروبات لهذه العقاقير. ولكن وجد أن كل سلالات هذا الميكروب تحتوى على جين (الميك – ايه) الذى يعد المسئول والمحدد الرئيسى لمقاومة عقار المثيسيللين حيث يعمل هذا الجين على انتاج مستقبل غير طبيعى (PBP2') له أرتباطية ضعيفة لربط عقاقير البيتا اللاكتام.

يعتبر المصدر الرئيسى للعدوى بهذا الميكروب الاشخاص المصابين بعدوى أو الحاملين لهذا الميكروب من المرضى بدون أصابة كما تعتبر أهم وسيلة لأنتقال هذا الميكروب بين المرضى تلوث أيدى العاملين بالرعاية الصحية بهذا الميكروب، وكذلك الاسطح البيئية الملوثة . و بناء عليه،فان ايجاد وسيله للمسح والكشف السريع للمرضى الحاملون لهاذا الميكروب ,يعتبر وسيله فعاله وهامه من وسائل مكافحة العدوى التى تساعد على منع انتشار هذا الميكروب فى المستشفيات.

تستخدم وسائل متعددة للتعرف على هذا الميكروب على مستوى العالم ويعتبر إستخدام أجار المانيتول الملحى المزود بعقار الاوكساسيللين من اكثر الوسائل الشائعة للكشف عن هذا الميكروب إلا أنه وجدت بعض السلالات من هذا الميكروب لاتخمر المانيتول كما يوجد ايضا سلالات أخرى من ميكروب المكور العنقودى سالب الكواجيوليز القادرة على تخمير المانيتول مما يعطى نتائج إيجابية خاطئة ، وقد اكدت دراسات كثيرة قلة حساسية و خصوصية تلك الوسائل .

تعتبر المقاومة لعقار السيبروفلوكساسين من الوسائل الشائعة للتعرف على هذا الميكروب, والتى أستخدمت كأساس فى بعض وسائل التشخيص كأجار بيرد باركر و المانيتول بروث ,إلا أنه يوجد بعض السلالات من هذا الميكروب الحساسة لهذا العقار مما يقلل من حساسية و خصوصية تلك الوسائل .

تعتبر التقنيات الجزيئية لتشخيص الميك أيه جين الوسيلة المثلى لتشخيص هذا الميكروب حيث يتميز بالحساسية و الخصوصية و السرعة لكن توجد بعض العيوب فى هذه الوسائل ، كغلاء المستلزمات اللازمة لاجراء هذه الاختبارات و وجوب وجود أجهزة عالية التقنية والتى لا تتوفر فى معظم المعامل. كما أن أستخدام هذا الاختبار يتطلب زرع الميكروب مسبقا على مستنبت مغذى مما يفقد هذه الوسائل السرعة التى تتميز بها.

ولهذا أستخدمت وسائل سريعة و بديلة و التى تتضمن الوسط الملون لتشخيص هذا الميكروب. و يتميز هذا الوسط بالحساسية و الخصوصية و السرعة مقارنة بالوسائل الأخرى. يعتمد أساس عمل هذا الوسط على وجود مادة قابلة للتلون عديمة اللون مماثلة لبعض المواد التى تعمل عليها الانزيمات البكتيريه ، وبالآضافة إلى ذلك فإن الوسط الملون يحتوى على مضادات حيوية متفرقة تمنع نمو سلالات الميكروب المكور العنقودى الحساس لعقار المثيسيللين.

الهدف من البحث :

يهدف هذا البحث الى ايجاد استراتيجيه سريعه يعتمد عليها للكشف المباشر عن الميكروب المكور العنقودى المقاوم لعقار المثيسيللين فى المسحات الانفيه الماخوذه بغرض المسح لهاذا الميكروب, عن طريق مقارنة حساسية وخصوصية الوسط الملون الخاص بالتعرف على هذه البكتيريا بالوسائل الاخرى المعتاد أستخدامها .

خطة البحث :

سوف يتم هذا البحث بوحدة الميكروبيولوجى فى قسم الباثولوجيا الاكلينيكة بجامعة عين شمس، وسوف تتم الدراسة على ١٠٠ عينة مسحه انفيه ماخوذه من المرضى المحجوزين بوحدات الرعايه المركزه .سوف يتم ادخال المسحات الى معمل الميكروبيولوجى فورا للكشف عن المرضى الحاملون لهاإذا الميكروب كالاتى:

١- سوف يتم زرع المسحات الانفيه مباشرة على الوسط الملون والاجار المسحى لمقاومة عقار الاوكساسيللين والاجار الدموى.
٢- المستعمرات اللتى توحى بانها الميكروب المكور العنقودى سوف يتم التاكد منها عن طريق الوسائل المعتاده فى معمل الميكروبيولوجى و هى صبغة الجرام,اختبارcatalase ,اختبار

coagulase بواسطة الشريحه و الامبوبه و الزرع على اجار المانيتول الملحى واختبارDNase .

٣- سوف يتم التاكد من الحساسيه لعقار الميتيسيللين بالوسائل الاتيه:

- استخدام القرص الانتشارى لعقار السيفوكستين ٣٠ مجم
- للتأكد من وجود جين الميك أيه سوف نقوم بأستخدام أختبار اللاتيكس التجلطى .

Acknowledgment

First of all, I wish to express my sincere thanks to ***Allah*** for *his care and generosity throughout my life.*

I appreciate the great effort of ***Prof. Hadia Hussein Bassim,*** *Professor of Clinical and Chemical Pathology, Ain Shams University, who helped me by her precious opinions and contributive comments that served much in the construction of this work*

I would like to express my great thanks ***to Prof. Manal Abd El Alim Abd El Sattar,*** *Professor of Clinical and Chemical Pathology, Ain Shams University for for her kind help and assistance, valuable supervision, continuous advice, faithful concern and energetic help to ensure that this work would reach an updated level.*

I wish to express my profound gratitude and sincere appreciation to ***Dr. Hala Mahmoud Hafez,*** *Lecturer of Clinical and Chemical Pathology, Ain Shams University, for her instructive guidance, valuable suggestions, criticism and supervision, as well as her kindness, continuous encouragement and kind help made this work come to light.*

At last, I am indebted to my family for their great support, patience, and continuous encouragement.

Osama Ahmed Soltan

List of Contents

Title	*Page*
List of abbreviation	i
List of tables	iii
List of figures	iv
Introduction and Aim of The work	1
Review of Literature	4
Staphylococcus aureus, an overview	4
Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	7
-Historical Aspect	7
-Mechanism of resistance to Methicillin	8
-Epedimiology of MRSA	20
- Types of MRSA infection	24
-Impact of MRSA infection	32
Laboratory Diagnosis of MRSA	34
-Methicillin suscebtibility testing	34
-Detection of MRSA in screening sample	42
Antimicrobial agents active against MRSA	58
Prevention and Control of MRSA	67
Materials and Methods	76
Results	87
Discussion	95
Summary	103
References	101
Arabic Summary	

List of abbreviation

AK	:	Adenylate kinase
aux genes	:	Auxiliary genes
BORSA	:	Borderline resistant Staphylococcus aureus
BPC media	:	Baired Parker media with Ciprofloxacin
(β)-lactam	:	Beta lactam
CA-MRSA	:	Community acquired Methicillin Resistant Stapylococcus aureus
CDC	:	Center for disease control and prevention
ClSI	:	Clinical and laboratory standard institute
CoNS	:	Coagulase negative Staphylococci
DOTEMSA	:	Desferrioxamine oxacillin tellurite egg yolk mannitol salt agar
DST	:	Diagnostic Senisitivty Test (DST) agars
EMRSA	:	Epidemic Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
E-test	:	Epslometer test
fem genes	:	Factors essential for the expression of methicillin resistance
FDA	:	United States food and drug administration
HA-MRSA	:	Hospital acquired Methicillin resistant Staphylococcus aureus
HPLC	:	High performance liquid chromatography
ICU	:	Intensive Care Unit.
MASO	:	Mannitol salt agar with oxacillin
MH	:	Muller Hinton agar
MIC	:	Minimal inhibitory concentration
MRSA	:	Methicillin Resistant Staphylococcus aureus
MSSA	:	Methicillin senestive Staphylococcus aureus
NaCl	:	Sodium chloride
ORSA	:	Oxacillin Resistance Screening Agar

PBP	:	Penicillin Binding Protien
PCR	:	Polymerase Chain reaction
PFGE	:	Pulsed field gel electrophoresis
SCCmec	:	Staphylococcal chromosomal cassette.
VISA	:	Vancomycin intermediate resistant Staphylococcus aureus
VRE	:	Vancomycin resistant enterococci
VRSA	:	Vancomycin resistant Staphylococcus aureus

List of Tables

Table	Title	Page
(1):	Comparison between hospital- and community-acquired MRSA	30
(2):	Basic principles for controlling spread of MRSA.	68
(3):	Association between the chromID^{TM} MRSA and the PBP2a.	80
(4):	Association between the ORSAB medium versus the PBP2a.	80
(5):	Association between the cefoxitin disc diffusion method versus PBP2a.	81
(6):	Association between chromID^{TM} MRSA and ORSAB medium	81
(7):	Diagnostic performance of the chromID^{TM} MRSA, ORSAB medium and cefoxitin disc diffusion test.	82
(8):	Comparison between colonized and non-colonized patients regarding the total duration of hospitalization and the duration of ICU stay	83
(9):	Association between the use antibiotics and the colonization with MRSA	83
(10):	Association between the use of ß-lactam, quinolones, glycopeptides antibiotics and the colonization with MRSA	84

List of Figures

Fig.	Title	Page
(1):	Schematic presentation of the Gram positive cell wall.	9
(2):	Peptidoglycan cross-link.	10
(3):	Action of ß-lactam antibiotics on the peptidoglycan structure of the bacterial cell wall.	11
(4):	Organization of the *SCCmec* region of DNA and chromosomal location.	13
(5):	Regulation of *mec*A gene.	14
(6):	Sites of peptidoglycan precursor synthesis at which blocks occur in *fem* mutants.	17
(7):	Appearance of MRSA strains in BPC media.	41
(8):	Colonies of MRSA growing on CHROMID MRSA agar (A) and MRSA Select agar (B)	44
(9):	Steps involved in BacLite MRSA assay.	46
(10):	Flowchart of an immuno-qPCR assay for rapid MRSA identification.	49

List of Photos

	Title	Page
Photo (1):	Appearance of MRSA on ChromID™ MRSA agar.	72
Photo (2):	Appearance of MRSA on ORSAB medium.	72

List of Contents

Title	*Page*
List of abbreviation	i
List of tables	iii
List of figures	iv
List of photos	v
Introduction and Aim of The work	1
Review of Literature	5
Staphylococcus aureus, an overview	5
Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ..	5
- Historical Aspect	8
- Mechanism of resistance to Methicillin	8
- Epedimiology of MRSA	19
- Types of MRSA infection	23
- Impact of MRSA infection	30
Laboratory Diagnosis of MRSA	32
-Methicillin suscebtibility testing	32
-Detection of MRSA in screening sample	39
Antimicrobial agents active against MRSA	53
Prevention and Control of MRSA	61
Materials and Methods	69
Results	79
Discussion	85
Summary	93
Conclusion and Recommendations	95
References	96
Arabic Summary	--