دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ودوم–شماره ۱۱۴
دی ۱۳۹۳

مقایسه روش فنوتیپی سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و PCR ژن *mecA* برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

نویسندگان: ثاره سادات حسینی[۱]، محمد نیاکان[۲*]، حوریه صادری[۳] و محمد ایمان عینی[٤]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. استادیار میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. استاد میکرب‌شناسی مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

٤. دانشیار میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ایران

* نویسنده مسئول: محمد نیاکان E-mail: niakan1@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس است. در سال‌های اخیر، CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) در مواردی که از دیسک دیفیوژن برای شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده‌می‌شود، دیسک سفوکسیتین را توصیه‌کرده‌است. هدف از این مطالعه، ارزیابی روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین و مقایسه آن با روش PCR برای شناسایی ژن mecA بوده‌است.

مواد و روش‌ها: برای تأیید هویت ایزوله‌های جداشده از پنج بیمارستان منتخب در شهر تهران، تست‌های متداول بیوشیمیایی به همراه PCR ژن nuc (که برای این باکتری اختصاصی است) انجام‌شدند. برای شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، در روش دیسک دیفیوژن از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم طبق دستورالعمل CLSI استفاده‌شد؛ سپس روش PCR برای شناسایی ژن mecA به‌کاررفت.

نتایج: با آزمایش‌های فنوتیپی و PCR ژن nuc ، هویت ۱۰۱ ایزوله با عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تأییدشد. روش دیسک دیفیوژن نشان‌داد که تمامی ایزوله‌ها نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و لینزولید، حساس بودند و ۵۸ مورد از ایزوله‌ها نسبت‌به سفوکسیتین، مقاوم بودند که تمامی این ایزوله‌ها در روش PCR، ژن mecA را داشتند.

نتیجه‌گیری: بنابراین در آزمایشگاه‌هایی که روش‌های مولکولی، به‌عنوان روش‌های معمول (روتین) در تشخیص MRSA استفاده‌نمی‌شوند، به‌کارگیری روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن به‌عنوان روشی ساده و از لحاظ اقتصادی کم‌هزینه، می‌تواند جانشینی مطلوب برای شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین باشد.

واژگان کلیدی : استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، سفوکسیتین، mecA ، PCR.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، باعث ایجاد طیفی گسترده از عفونت‌های بیمارستانی و بیماری‌ها ازجمله اندوکاردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، مسمومیت غذایی، کورک و دمل می‌شود (۱). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از عفونت با فاصله‌ای کوتاه پس از مصرف گزارش‌شده‌است. با مصرف پنی‌سیلین از سال ۱۹۵۰ باواسطه پلاسمیدهای تولیدکننده بتالاکتاماز در ایزوله‌های بالینی، مقاومت به آن ایجادشد. در ۱۹۵۹، متی‌سیلین به‌عنوان یک پنی‌سیلین نیمه‌صناعی معرفی‌شد؛ اما در سال ۱۹۶۰، ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین شناسایی‌شدند. شیوع (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus; MRSA) در ابتدا در بیمارستان‌های اروپا گزارش‌شد، ولی به‌سرعت، کلون‌های MRSA در جهان پخش‌شدند (۱و۲).

مقاومت به متی‌سیلین توسط یک قطعه کروموزومی با عنوان sccmec (staphylococcal cassette chromosome mec) که حاوی ژن mecA است، ایجادمی‌شود؛ این ژن، پروتئینی به نام PBP2a (penicillin binding protein 2a) را کدمی‌کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد (۳). سویه‌های MRSA، تهدیدی جدی در عفونت‌های بیمارستانی محسوب‌می‌شوند و بررسی‌ها مدت طولانی‌تر بستری بیمارانی را که عفونت با MRSA دارند، نسبت‌به بیماران مبتلا به MSSA (Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus) در بیمارستان‌ها نشان‌داده‌اند که این امر، موجب صرف هزینه‌های درمانی بیشتر و همچنین پیشرفت عفونت و میزان مرگ‌ومیر بیشتر ناشی از این سویه‌ها نسبت‌به سویه‌های MSSA می‌شود؛ درنتیجه، تشخیص به‌موقع MRSA، از انتشار این سویه‌ها در بیمارستان‌ها جلوگیری‌می‌کند (٤و٥).

در سال‌های اخیر، استفاده از سفوکسیتین که یک القاگر قوی ژن mecA است، به‌عنوان شاخص (مارکر) شناسایی ژن mecA گزارش‌شده‌است (٦و٧).

همچنین (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI، استفاده از سفوکسیتین را برای شناسایی ژن mecA توصیه‌کرده‌است (۸).

هدف از این مطالعه، ارزیابی روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین برای شناسایی ایزوله‌های بالینی مقاوم به متی‌سیلین و مقایسه آن با روش مولکولی PCR است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی- تجربی، تعداد ۱۰۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از پنج بیمارستان منتخب شهر تهران و از نمونه‌های مختلف بالینی در بیماران بستری جداشدند.

نمونه‌ها شامل زخم (۲۹ نمونه)، ادرار (۲۵ نمونه)، خلط (١٤نمونه)، خون (۱۱ نمونه)، آبسه (٦ نمونه)، CSF (٤ نمونه) و سایر نمونه‌ها ازجمله مایع مفصل، مایع پلور و تراشه (۱۲ نمونه) بودند؛ سپس تأیید هویت ایزوله‌ها با آزمایش‌هایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، DNase، رشد روی محیط مانیتول سالت آگار و کواگولاز لام و در لوله انجام‌شد. برای نگهداری ایزوله‌ها از محیطی نگهدارنده، شامل TSB(Tryptic soy broth) (Merck, Germany) دارای ۲۰ درصد گلیسرول استفاده‌شد؛ سپس ایزوله‌ها شماره‌گذاری و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری‌شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA باکتری، طبق روش *پرز- روت*[1] و همکارانش با کمی تغییر انجام‌شد (۹)؛ در این روش، چند کلنی از کشت ٢٤ساعتی باکتری به میکروتیوب حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط TSB افزوده شدند و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه

[1] - Prez Rot

Archive of SID

www.SID.ir

قرارگرفتند. پس از انجام سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰، محلول رویی جداشده به‌عنوان الگو در آزمایش PCR به‌کاررفت.

PCR برای شناسایی ژن nuc

پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی تکثیر ژن nuc با استفاده از پرایمرهای در جدول ۱ انجام‌شد. روشPCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، dNTP ۱ mM، MgCl 2 ۵ mM، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ U از آنزیم Taq پلیمراز و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام‌شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

منبع	اندازه محصول (bp)	دما	توالی پرایمر('3–'5)	ژن
(۱۰)	۶۱۳	۵۵°C	5'-CTGGCATATGTATGGCAATTGTT-3' 5'-TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT-3'	*nuc*
(۱۱)	۳۱۰	۵۸°C	5'-GATGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'	*mec A*

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای تمامی ایزوله‌ها، آزمایش انتشار دیسک با استفاده از دیسک‌های تهیه‌شده از شرکت (MAST, Diagnostics, UK) که شامل لینزولید (Linezolid۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (Vancomycin۳۰ میکروگرم) و سفوکسیتین (Cefoxitin۳۰ میکروگرم) در محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) انجام‌شد؛ در این روش از کشت ۲٤ساعتی باکتری، سوسپانسیونی معادل نیم‌مک‌فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و کشت چمنی باکتری انجام‌شد؛ سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی روی آن قرارگرفتند و پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت انکوباسیون‌شدند. قطر هاله عدم رشد هر دیسک با توجه به معیارهای CLSI، اندازه‌گیری و تفسیرشد (۸). استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل در این آزمایش‌ها استفاده‌شد.

PCR برای شناسایی ژن mecA

شناسایی ژن mecA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توالی آنها و طول قطعه تکثیریافته آن در جدول ۱ نشان‌داده‌شده‌است، برای تمامی ایزوله‌ها انجام‌شد. PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط، شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/٤ میکرولیتر dNTP، ۰/۸ میکرولیتر MgCl 2 ، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/٤ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز و ۵ میکرولیتر DNA الگو استفاده‌شد که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

شناسایی محصول PCR

پس از اتمام واکنش، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از بافر TBE 0.5 x، مورد الکتروفورز قرارگرفت و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید، ایجاد باند توسط دستگاه ژل داکومنتیشن مورد مطالعه قرارگرفت. اندازه محصول PCR با استفاده از 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany) مشخص شد. پرایمرهای مورد استفاده از شرکت Bio neer کره

Archive of SID
www.SID.ir

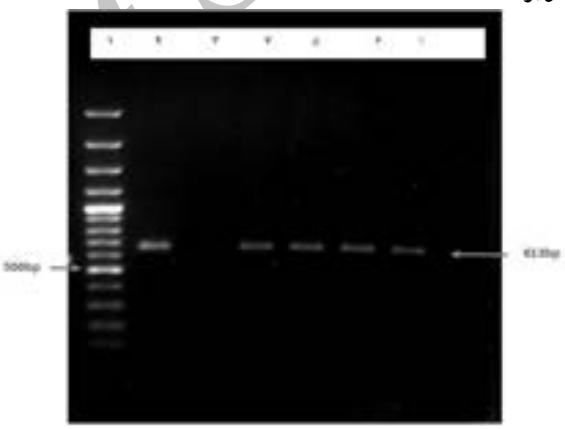
جنوبی تهیه و بقیه مواد به‌کاررفته در PCR از شرکت سیناژن ایران خریداری‌شده‌بودند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

پس از گردآوری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، Excel و با آزمون کای‌دو (X2) به‌ازای p<0/05 تحلیل آماری انجام‌شد.

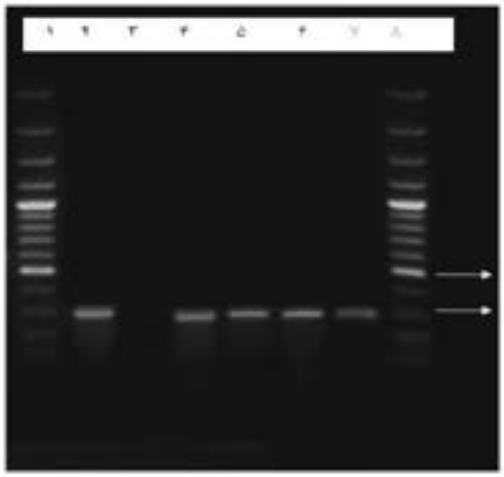
نتایج

با آزمایش‌های تأییدی فنوتیپی (رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، رشد روی محیط مانیتول سالت آگار و کواگولاز روی لام و لوله) و PCR ژن nuc، هویت ۱۰۱ ایزوله به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تأییدشد (تصویر۱).



تصویر ۱. آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن *nuc* . ۱) نشانگر؛ ۲) کنترل مثبت (۶۱۳ جفت باز)؛ ۳) کنترل منفی. ٤، ٥،٦ ، ٧) نمونه‌های مثبت بالینی

محدوده سنی بیماران در طول مدت مطالعه ۱ تا ۸۵ سال با میانگین۲۰/۲ ±٤٤/۲ سال بود. با روش دیسک دیفیوژن، تمامی ایزوله‌ها نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های لینزولید و ونکومایسین، حساس بودند. (٥٧/٤ درصد) ۵۸ ایزوله نسبت‌به سفوکسیتین، مقاوم بودند که MRSA درنظرگرفته‌شدند. تمامی ایزوله‌ها از لحاظ ژن mecA بررسی‌شدند که هیچ‌یک از ایزوله‌های حساس به متی‌سیلین، این ژن را نداشتند. تمامی ۵۸ ایزوله‌ای که در روش دیسک دیفیوژن نسبت‌به سفوکسیتین، مقاوم بودند، در روش ژنتیکی، دارای ژن mecA بودند (تصویر۲).



تصویر ۲. آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن *mec A* . ۸،۱) نشانگر ؛۲) کنترل مثبت (۳۱۰ جفت باز)؛۳) کنترل منفی. ٤،٥،٦،٧) نمونه‌های مثبت بالینی

حساسیت و اختصاصیت روش‌های استفاده از دیسک سفوکسی‌تین و PCR برای شناسایی MRSA در این مطالعه، در جدول ۲ نشان‌داده‌شده‌است. از میان ۵۸ ایزوله‌ای که در روش PCR دارای ژن mecA بودند، در روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، ٤٢ ایزوله فاقد قطر هاله عدم رشد و ١٦ ایزوله دارای قطر هاله عدم رشد میان ۱۲ تا ۱۸ میلی‌متر بودند. ارتباطی معنی‌دار میان حضور ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های مختلف بالینی، سن و جنس بیماران مشاهده‌نشد (p>0.05).

جدول ۲. مقایسه روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و PCR برای شناسایی ایزوله‌های MRSA

روش	MRSA (تعداد)	حساسیت (٪)	اختصاصیت (٪)
سفوکسیتین دیسک دیفیوژن	۵۸	۱۰۰	۱۰۰
PCR برای شناسایی ژن *mecA*	۵۸	۱۰۰	۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

یکی از اقدام‌های مهم در پیشگیری از گسترش عفونت‌ها توسط استافیلوکوکوس اورئوس، شناسایی و درمان به‌موقع عفونت‌های ناشی از MRSA است. با توجه به اینکه میزان مرگ‌ومیر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی با ایزوله‌های MRSA بالاست، درمان صحیح عفونت‌ها و تعیین و آگاهی از الگوی منطقه‌ای مقاومت در انتخاب داروی مناسب کمک‌می‌کند (۱۲). شناسایی ژن mecA با استفاده از روش PCR، شیوهٔ استاندارد طلایی برای تأیید MRSA محسوب‌می‌شود (۱۳). مطالعات اخیر نشان‌داده‌اند که روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین نسبت‌به دیگر روش‌های فنوتیپی، مانند استفاده از دیسک اگزاسیلین ارجحیت‌دارد (۱٤) و امروزه، روشی توصیه‌شده توسط CLSI است (۸). *جان* و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی ۱۳۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس نشان‌دادند که حساسیت و اختصاصیت روش استفاده از دیسک سفوکسیتین به‌ترتیب، برابر ۱۰۰ درصد و۱۰۰ درصد بود (۱۵)؛ در مطالعه‌ای دیگر که *آناد* و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام‌دادند، تمامی ۳۲ ایزوله‌ای که در روش دیسک دیفیوژن نسبت‌به سفوکسی‌تین مقاوم بودند، در روش PCR نیز، ژن mecA داشتند (۱٦)؛ همچنین *ماتوس* و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه خود نشان‌دادند که حساسیت و اختصاصیت روش استفاده از دیسک سفوکسی‌تین برای شناسایی MRSA، به‌ترتیب، برابر ۱۰۰ درصد و۱۰۰ درصد بود (۱۷) که نتایج این مطالعات در تأیید نتایج مطالعه اخیر ما هستند. امروزه روش‌هایی متعدد برای شناسایی MRSA در سراسر جهان استفاده‌می‌شوند. تعیین ژن mecA توسط روش PCR به‌عنوان روش استاندارد طلایی درنظرگرفته‌می‌شود که به‌طور معمول (روتین) در بیمارستان‌ها در دسترس نیست و هزینه‌ای بالا دارد؛ با توجه به نتایج این مطالعه در مواردی که روش‌های مولکولی برای تشخیص MRSA در دسترس نیستند، می‌توان از روش فنوتیپی سفوکسیتین دیسک دیفیوژن که روشی کم‌هزینه، آسان و قابل‌اجرا بوده در همه مراکز تشخیصی برای شناسایی MRSA استفاده‌کرد. مطالعات اپیدمیولوژیک با استفاده از روش‌های تایپینگ (Typing) برای شناسایی کلون‌های مسئول لازم است. با توجه به اینکه تمامی ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و لینزولید، حساس بودند، می‌توان کارایی این آنتی‌بیوتیک‌ها را در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، مؤثر دانست.

سپاس و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکرب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد انجام‌گرفته‌است.

منابع

1. Shopsin Bo, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Disease. 2001; 7(2): 323-26.
2. Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. British Medical Journal. 1963; 1(5326): 308-11.
3. Lim D, Styrindka NC. Structure basis for the beta lactam resistance of PBP 2a from MRSA. Natural structure Biology. 2002; 9(11): 870-76.
4. Chang FY, Macdonald BB, Peacock JE, Musher DM, Triplett P, Mayotte JM, et al. A prospective multicenter study of staphylococcus aureus bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. Medicine (Baltimore). 2003; 82(5): 322-32.
5. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Ruden H. Mortality risk factors with nosocomial staphylococcus aureus infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). Infection. 2005; 33(2):50-55.
6. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Using Cefoxitin Disk Diffusion (DD) in a Collection of *Staphylococcus aureus* Expressing Borderline oxacillin MIC. Diagnostic Microbiology Infection Disease. 2007; 58:33-39.
7. Swenson JM, Tenover FC; the Cefoxitin Disk Study Group Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate

Archive of SID

www.SID.ir

with presence of mecA in *Staphylococcus* spp. Journal Clinical Microbiology. 2005; 43:3818-23.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty two informational supplement (M100-S22). Wayne, USA; 2012.
9. Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. Journal Clinical Microbiology. 2001, 39(11): 4037-41.
10. Blackburn p.s.The variation in the cell count of cow's milk throughout lactation and from one lactation to the next. Journal Dairy Research. 1966; 33: 193-98.
11. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase negative staphylococci. Journal Clinical Microbiology. 2004; 42(11): 4947-955.
12. Chambers HF. Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews .1997; 10(4):781-791.
13. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A, Karlsson A, Mills K, et al. Phenotypic etest detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and on Mueller-Hinton agar. Journal Clinical Microbiology. 2006; 44:4395-99.
14. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B, *et al.* Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003; 52:204-07.
15. John MA, Burden J, Stuart JI, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z . Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in Staphylococcus spp. reveals a species-dependent performance. Journal of Antimicrob Chemother. 2009; 63:493-96.
16. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila KComparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. Indian Journal Medical Microbiology. 2009; 27:27-29.
17. Matos PD, Schuenck RP, Cavalcante FS, Caboclo RM, Santos KR. Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCC mec types. Journal of Oswaldo Cruz. 2010; 105:931-34.

Archive of SID

www.SID.ir