Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۱، شماره ۶، صفحات ۴۲۰ تا ۴۲۵، (۱۳۸۲)

مقایسه روش تعیین حساسیت دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین

دکتر اکبر میرصالحیان* (دانشیار)، فرشته جبل‌عاملی (عضو هیئت علمی گروه میکروب‌شناسی)، دکتر بهرام کاظمی** (دانشیار)، دکتر صفرعلی علیزاده (کارشناس ارشد میکروب‌شناسی)

* گروه میکروب‌شناسی- دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

** دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

چکیده

مقدمه: در بین باکتری‌های مؤثر در عفونت‌های بیمارستانی، جنس استافیلوکوکوس‌ها از جایگاه خاصی برخوردار می‌باشند. متأسفانه حدود ۹۰٪ از سویه‌های استافیلوکوکسی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی به پنی‌سیلین مقاوم هستند و میزان مقاومت این سویه‌ها به پنی‌سیلین‌های صناعی مقاوم به بتالاکتاماز مانند متی‌سیلین و اگزاسیلین نیز رو به فزونی می‌باشد. از این رو درمان چنین عفونت‌هایی مشکل بوده و شناسایی سریع این عوامل در درمان اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۸۵ سویه استافیلوکوکسی کواگولاز منفی و ۷۰ سویه کواگولاز مثبت از بیماران بستری در بیمارستان‌های دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان جدا گردید و با روش دیسک دیفیوژن مطابق روش استاندارد NCCLS تعیین حساسیت شدند و سپس با نتایج حاصل از واکنش PCR جهت جستجوی ژن mec A مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج بدست آمده ۶۲ سویه استافیلوکوکسی کواگولاز منفی (۷۲/۹٪) و ۲۷ سویه استافیلوکوکسی کواگولاز مثبت (۳۸/۶٪) با روش دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند اما در روش PCR، ۶۳ سویه استافیلوکوکسی کواگولاز منفی (۷۴٪) و ۲۸ استافیلوکوکسی کواگولاز مثبت (۴۰٪) دارای ژن mec A بودند.

نتیجه گیری و توصیه ها: در مطالعه مذکور، روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR (به عنوان gold standard) برای شناسایی استافیلوکوکسی کواگولاز منفی دارای حساسیت ۹۶/۲۸٪، ویژگی ۹۵/۵۴٪ و دقت ۹۴/۷۴٪ و برای استافیلوکوکسی کواگولاز مثبت دارای حساسیت ۹۲/۵۸٪، ویژگی ۹۷/۱۶٪ و دقت ۹۵/۱۷٪ بود. می‌توان گفت روش‌های فنوتیپی مانند دیسک دیفیوژن به علت اینکه تحت اثر شرایط محیط رشد باکتری قرار می‌گیرند در مقایسه با روش‌های ژنوتیپی مانند PCR در جستجوی ژن mec A، حساسیت و ویژگی پایین‌تری هستند و قادر نیستند ۱۰۰٪ سویه‌های استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین را شناسایی کنند

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه استافیلوکوکوس اورئوس و دیگر سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین در بسیاری از مناطق جهان بویژه در بیمارستانها و مراکز درمانی شیوع یافته‌اند. این باکتریها علاوه بر متی‌سیلین نسبت به تعداد زیادی از داروهای ضد میکربی مقاوم هستند و مشکلات فراوانی را برای بیماران بستری در بیمارستانها علی‌الخصوص بخش‌های پرخطر مثل ICU ، سوانح، سوختگی و سرطان ایجاد می‌کنند. بنابراین شناسایی دقیق و سریع این باکتریها در درمان عفونت‌های ناشی از آن ارزشمند است (۱،۲).

در حال حاضر آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی با اتکا به روشهای فنوتیپی اقدام به شناسایی استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین می‌نمایند، از جمله رایج‌ترین آنها روش دیسک دیفیوژن می‌باشد که عوامل مختلف محیط بر رشد باکتری‌ها و نتایج آن مؤثر هستند. با وجودی که NCCLS برای کاهش اثرات جانبی این عوامل و استاندارد کردن آنها دستورالعمل‌هایی را تهیه و ارائه نموده است اما درصدی از سویه‌های استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین که به صورت هتروژن نسبت به این دارو مقاومت می‌نمایند و یا مقاومت پایینی دارند، با این روش‌ها تشخیص داده نمی‌شوند و بطور کاذب حساس ظاهر می‌شوند، در حالیکه به طور بالقوه مقاومت بالایی نسبت به متی‌سلین نشان می‌دهند که در درمان‌های ناموفق عفونت ناشی از سویه‌های هتروژن مقاوم به متی‌سیلین، اگزاسیلین و بسیاری از داروهای ضد میکروبی دیگر در کلینیک به اثبات رسیده است (۳،٤).

علت این هتروژنیسیته به ژن mec A موجود در کروموزوم این باکتریها ارتباط دارد. این ژن پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین تغییر ماهیت یافته‌ای (PBP 2a, 2') که تمایل کمی در اتصال به پنی‌سیلین و دیگر داروهای دسته بتالاکتام از جمله متی‌سیلین و طیف وسیعی از داروهای ضد میکروبی مثل کلیندامایسین، اریترومایسین، تتراسیکلین، جنتامیسین و کوتریموکسازول دارند را کد می‌کند و باعث مقاومت نسبت به این مواد می‌شوند. بنابراین برای بررسی مقاومت نسبت به متی‌سیلین در استافیلوکوکسی، بهتر است که خود ژن عامل مقاومت با روش‌های مولکولی مورد ارزیابی قرار گیرند، چون عوامل محیطی روی آن اثر ندارد و از حساسیت، ویژگی و دقت بالایی برخوردار است. از جمله این روشها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد که با آن قطعه‌ای از ژن مربوطه و محدود به دو پرایمر F و R بوسیله آنزیم DNA پلیمراز مورد تکثیر و سپس آشکارسازی قرار می‌گیرد (۷،۸).

روش PCR برای شناسایی ژن mec A بسیار حساستر، دقیقتر و کارآتر از روش‌های معمول در تشخیص استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین و به عنوان Gold standard می‌باشد (۹،۱۰،۱۱،۱۲).

به همین علت در مطالعه حاضر روش دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) با واکنش PCR برای جستجوی ژن mec A در تشخیص این باکتری‌ها مورد مقایسه قرار گرفت و حساسیت، ویژگی و دقت آن نسبت به PCR تعیین شد.

مواد و روشها

تعداد ۱۵۵ سویه از گونه‌های مختلف استافیلوکوکسی از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه میکروب‌شناسی دانشکده علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. باکتری‌های ایزوله شده با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی تعیین هویت گردیدند. چون حساسیت استافیلوکوک‌ها نسبت به اگزاسیلین مشابه متی‌سیلین بوده و اگزاسیلین در شرایط آزمایشگاه پایدارتر از متی‌سیلین می‌باشد، از دیسک‌های اگزاسیلین ۱ میکروگرمی (oxoid) استفاده گردید. تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن براساس روش استاندارد NCCLS انجام شد. براساس این روش استاندارد از محیط کشت CAMHA (Cation Adjested Muller Hint Agar) به اضافه ۲٪ NaCl استفاده شد و حساسیت باکتری‌ها بعد از ۲٤ ساعت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید.

به منظور انجام روش PCR، ابتدا با توجه به نقشه ژنتیکی ژن mec A، دو پرایمر F و R با توالی ۳-

www.SID.ir

Archive of SID

۳- MCTF -۵ TGGCTGTCGTGTCACAATCG
MCTR -۵ CTGGAACTTGAGCAGAG طراحی گردید. این پرایمرها قطعه‌ای به اندازه ۳۰۳ BP از ژن mec A را تکثیر می‌نمایند. برای استخراج DNA، سویه‌های مورد نظر از بافر NET (EDTA= 100 mM, NaCl= 100mM, Tris= 10mM, Triton 100x 1% w/v) و روش ذوب و انجماد و فنل‌کلروفرم استفاده گردید.

سپس موارد زیر در غلظت‌های ذکر شده تهیه گردید:

میکرولیتر ۳ =۱۰ x PCR Buffer

میکرولیتر ۲/۵ =$MgCl_2$

میکرولیتر ۳ =dNTPmix(10mM)

میکرولیتر ۵ =DNA (Templet)

میکرولیتر ۱۵/۶۵ =D.W

و مخلوط این مواد در دستگاه ترموسایکلر با برنامه زیر قرار داده شد:

تعداد سیکل‌ها =۳۵، دمای predenaturation= ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، دمای Denaturation= ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای Annealing= ۵۷°C مدت ۴۵ ثانیه، دمای Entention= ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای post extention= ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه.

بعد از اتمام واکنش PCR، محصول آن روی ژل آگار ۲٪ الکتروفورز شد و نوارهای DNA به اندازه bp ۳۰۳ با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی شدند و با دستگاه UV Translluminator قابل رؤیت گردیدند (شکل ۱). بعد از حصول نتایج، با استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل آماری، حساسیت روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با روش PCR مطابق جداول ۲ و ۳ بدست آمد.

یافته‌ها

از ۱۵۵ سویه استافیلوکوکسی جمع‌آوری شده، ۷۰ سویه کواگولاز مثبت (۴۵/۱۶٪) و ۸۵ سویه کواگولاز منفی (۵۴/۸۴٪) بودند. ۲۷ سویه کواگولاز مثبت (۳۸/۶٪) و ۶۲ سویه کواگولاز منفی (۷۲/۹٪) با روش دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند در حالیکه ژن mec A بوسیله روش PCR به ترتیب در ۲۸ (۴۰٪) و ۶۳ سویه (۷۴٪) از آنها مثبت بود (جدول ۱). بنابراین از ۶۳ سویه کواگولاز منفی حاوی ژن mec A تنها ۶۱ سویه به عنوان مقاوم به متی‌سیلین با روش دیسک دیفیوژن تشخیص داده شد (جدول ۲ و ۳).

جدول شماره ۱- نتایج آزمایشات DAP و PCR در شناسایی استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین

آزمایش	DAD		PCR	
باکتری	مقاوم	حساس	mec^+	mec^-
کواگولاز +	۲۷	۴۳	۲۸	۴۲
کواگولاز -	۶۲	۲۳	۶۳	۲۲
جمع	۸۹	۶۶	۹۱	۶۴

جدول شماره ۲- مقایسه Disk با PCR در تشخیص استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت مقاوم به اگزاسیلین

PCR	مثبت	منفی	جمع
Disk			
مقاوم	۲۶	۱	۲۷
حساس	۲	۴۱	۴۳
جمع	۲۸	۴۲	۷۰

حساسیت =۹۲/۸۵٪

ارزش اخباری مثبت =۹۶/۲۹

جدول شماره ۳- مقایسه PCR با Disk در تشخیص استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی مقاوم به اگزاسیلین

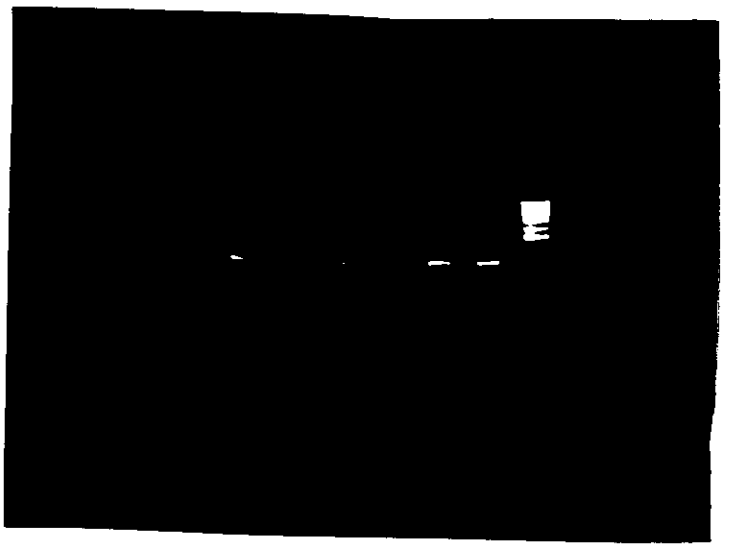
PCR	مثبت	منفی	جمع
Disk			
مقاوم	۶۱	۱	۶۲
حساس	۲	۲۱	۲۳
جمع	۶۳	۲۲	۸۵

حساسیت =۹۶/۸۲٪

ارزش اخباری مثبت =۹۸/۳۸

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۱- ژل الکتروفورز شده حاوی باندهای bp ۳۰۳ تکثیر شده ژل mec A به همراه DNA Marker

بحث

ژن mec A موجود در کروموزوم استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین پروتئین‌های تغییر ماهیت داده‌ای را کد می‌کند (PBP 2a, 2') که تمایل کمی جهت اتصال به داروهای بتالاکتام از جمله متی‌سیلین و اگزاسیلین دارند و باعث مقاومت نسبت به این داروها می‌شوند. در ضمن تعداد نادری از سویه‌های استافیلوکوکوس فاقد ژن mec A به علت تولید بتالاکتاماز فراوان یا حضور پروتئین‌های اتصالی باند شونده به پنی‌سیلین نسبت به متی‌سیلین (اگزاسیلین) مقاومت نشان می‌دهند. با وجود این بعلت عدم بیان ژن mec A در آزمایشهای تعیین حساسیت داروهای ضد میکروبی، مقاومت به متی‌سیلین (اگزاسیلین) در بعضی از سویه‌های استافیلوکوکسی حاوی ژن mec A ظاهر نمی‌شود، و این باکتریها بطور کاذب حساس تشخیص داده می‌شوند. به علت این نتایج نامتجانس، NCCLS شرایط انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت نسبت به متی‌سیلین در استافیلوکوکسی را تغییر داده است حتی برای استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی و کوآگولاز مثبت، روش مجزایی را شرح داده است تا حساسیت، ویژگی و دقت آنها را افزایش دهد (۱۳). اما هنوز هم محققین در سراسر دنیا مواردی از ناتوانی روشهای رایج در تشخیص این باکتریها را گزارش نموده‌اند که به عنوان مثال می‌توان موارد زیر را ذکر نمود.

Mulder JG در سال ۱۹۹۶ از ۲۲۵ سویه استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی حاوی ژن mec A، ۲۱۸ سویه را با روش دیسک دیفیوژن مقاوم به متی‌سیلین تشخیص داد و یک سویه فاقد ژن mec A را نیز به عنوان مقاوم به متو سیلین شناسایی کرد (۱۰).

Kolbert C.P در سال ۱۹۹۸ در کالیفرنیا از ۴۱۶ سویه استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی، ۱۰ سویه حاوی ژن mec A را با روشهای فنوتیپی، حساس به اگزاسیلین و یک سویه mec A منفی را با روشهای فنوتیپی مقاوم تشخیص داد (۱۱).

Sakoulas George در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای روی ۲۰۳ سویه استافیلوکوکسی با روشهای فنوتیپی و PCR، دو

www.SID.ir

Archive of SID

سویه mec A مثبت را با روشهای فنوتیپی، حساس به متی‌سیلین تشخیص داد (١٢).

Tan TY در سال ٢٠٠٢ دو روش دیسک دیفیوژن و PCR را در شناسایی استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین با هم مقایسه کرد و حساسیت و ویژگی روش دیسک دیفیوژن را ٩٤ ٪ بدست آورد (١٤).

در مطالعه حاضر ٧٠ استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت با روش دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین تعیین حساسیت شدند و با روش PCR وجود ژن mec A در همه آنها مورد بررسی قرار گرفت و با نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن مقایسه گردید. در روش دیسک دیفیوژن ٣٨/٦٪ سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت و ٧٢/٩٪ سویه‌های کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین بودند در حالیکه سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت و کوآگولاز منفی به ترتیب ٤٠٪ و ٧٤٪ حاوی ژن mec A بودند.

بر مبنای یافته‌های مطالعه ما روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با روش PCR در شناسایی سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت، دارای حساسیت ٩٢/٨٥٪، ویژگی ٩٧/٦١٪، دقت ٩٥/٧١٪، ارزش اخباری مثبت ٩٦/٢٩٪ و ارزش اخباری منفی ٩٥/٢٤٪ بود و برای سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی نیز حساسیت ٩٦/٨٢٪، ویژگی ٩٥/٤٥٪، دقت ٩٤/٤٧٪، ارزش اخباری مثبت ٩٨/٣٨٪ و ارزش اخباری منفی ٩١/٣٪ داشت (جداول ٢ و ٣).

در مطالعه ما، ١ سویه از ٦٢ سویه استافیلوکوکسی کوآگولاز منفی در روش دیسک، مقاوم به متی‌سیلین و در روش PCR حساس بود. در سال ٢٠٠١ A.C Fluit در مطالعه اپیدمیولوژیکی مورد مشابهی را در سویه‌های MRSA گزارش نمود و اینگونه توجیه کرد که ممکن است آنزیم بتالاکتاماز فراوان تولید می‌کنند یا پروتئین‌های اتصالی دیگری غیر از 2a, 2' با تمایل کم در اتصال به متی‌سیلین در سطح سلول باکتری داشته باشند که باعث مقاومت به متی‌سیلین می‌شود و در واقع پروتئین تولید شده توسط ژنی غیر از ژن mec A کد می‌شود (١٥).

در این مطالعه، ١ سویه از استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت و منفی mec A+ با روش دیسک دیفیوژن به عنوان حساس شناسایی شد که بیانگر عدم بیان شدن ژن mec A در آزمایش تعیین حساسیت به روش دیسک می‌باشد.

با این توصیف در مطالعه ما، درصد کمی از سویه‌های استافیلوکوکسی کوآگولاز مثبت و منفی mec A+، با روش دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین حساس شناسایی شدند و مقاومت به متی‌سیلین (اگزاسیلین) در آنها تشخیص داده نشد. با توجه به فراوانی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکسی در جامعه و دوام و پایداری آنها در طبیعت (به علت مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها) و رایج نبودن روشهای مولکولی مثل PCR در آزمایشگاه‌ها جهت تشخیص این سویه‌ها، عدم تشخیص این باکتریها حتی به میزان کم نیز می‌تواند مشکلات فراوانی برای سیستم بهداشت و درمان ایجاد نمایند چون با پایدار ماندن و تکثیر یافتن، می‌توانند در جامعه و مراکز درمانی گسترش یافته و عفونت‌های متعدد و مقاوم به درمان را سبب شوند. از طرف دیگر هیچ آزمایشگاهی در عمل، اقدامات لازم جهت افزایش بیان mec A را در آزمایشهای تعیین حساسیت انجام نمی‌دهد و تقریباً تمام آزمایشگاه‌ها بعد از تعیین هویت عامل سببی عفونت بطور روتین آزمایش حساسیت میکربی را برای تمام داروهای در دسترس، بطور یکسان انجام می‌دهند و هیچ آزمایشگاهی استافیلوکوکوس‌ها را جداگانه نسبت به متی‌سیلین (اگزاسیلین) با رعایت شرایط اصلاح شده NCCLS تعیین حساسیت نمی‌کند، در نتیجه برحسب عدم شناسایی برخی از سویه‌های استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین می‌گردد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه پیشنهاد می‌گردد:

اولاً: به توصیه‌های NCCLS جهت شناسایی هر چه دقیق‌تر سویه‌های استافیلوکوکسی مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) توجه خاصی معطوف گردد

ثانیاً: با توجه به حساسیت و ویژگی بالای روش PCR از این روش جهت شناسایی سویه‌هایی که در عفونت بیمارستانی نقش با اهمیتی دارند استفاده گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Susan S. Hung, Richard platt. Risk of methicillin-resistant staphylococcus aureus after previous infection or colonization. Clin Infect Dis 2003; 36: 281-285.

2. Nitton A, Rezende MD, et al. Risk factors for methicillin-resistance among patients with staphylococcus aureus bacteremia at the time of hospital admission. Am J Med Sci 2002; 323(3): 117-123.

3. G. A. J. Ayliff. Hospital acquired infection, third edit oxford, Butterworth beinemann 2000; 440-488, 456-460.

4. Mahon Cnnie R, George Maselis. Textbook of diagnostic microbiology. 2 th ed. W B Sanders Company 2000; 81-82, 330-341.

5. Goth SH, Byrne Jh Zhang, A W Chow. Molecular typing of s. aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1992; 30: 1642-1645.

6. Moreno FC Grisp, JH Jorgensen. Methicillin-resistant S. aureus a community organism. Clin infect Dis 1995; 21: 1308-1312.

7. Murakami K W. Minamide, K. Wade, E. Nakarmura, J. Teraoka, S. Watanabe. Identification of methicillin resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 2240-2244.

8. Neil Woodford, Alan P, Johnson. 1998. Mullecular bacteriology. Humana press, Totwa, Newjersey. P: 437-441.

9. Y. Tokue, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay and conventional microbiologic method for detection of methicillin resistant staphylococcus aureus. Antimic. Agents and chemotherapy, 1992; 36(1).

10. Mulder JG. Regional public health laboratory. Groningen, the Netherlands. Comparison of disk diffusion, the e.test and detection of mec A for determination of methicillin resistance in coagulase negative Staphylococci. Eur J Microb Infec Dis 1996 Jul; 15.

11. Kolbert CP, Coolly JE, Lee MJ, Persing DH. Detection of the staphylococcal mecA gene by chemilumiescent DNA hybridization. Aug 1995; 33(8): 2179-2182.

12. Sakoulas GPC, Degirolami and HS Gold. Methicillin resistant staphylococcus aureus comparison of susceptibility testing methods and analysis of mec A positive strains. JCM 2001 Nov; 39(11): 3946-3951.

13. National committee for clinical laboratory standard. 2000 methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. 5 th ed. Approved standard M_7-A_5.

14. Tan Ty. Department of medical microbiology and public health laboratory, university hospital of Walse, Heaith park. Cardiff Jan. A comparison of PCR detection of mec A with two standard methods of oxacillin disk susceptibility testing for coagulase negative Staphylococci. Jurnal Med Microbiology 2002; 51(1): 83-85.

15. A.C Fluit, et al. Epidemiology and susceptibility of 3051 staphylococcus aureus isolate from 25 university hospitals participating in the Eur SENTRY study JCM 2001; 39(1): 3724-3732.

www.SID.ir