Archive of SID

Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol.48, No.87, P: 7 - 16
Spring 2005

دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
هشتاد و هفت، سال چهل و هشتم
بهار ۱۳۸٤، صفحه ١٦ - ٧

مقاله اصلی

تعیین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین از طریق روشهای فنوتیپیک

❖ **محبوبه نادری نسب[۱]، جلیل توکل افشاری[۲]، محمد ناظم[۳]، پریسا فاتح منش[۴]، حسین فرامرزی[۵]، محمد علی خدادوست[۶]**

[۱]استادیار میکروب شناسی، [۲] دانشیار ایمنولوژی، [۳] استاد میکروب شناسی، [٤]دانشجوی فوق لیسانس، [٥] رزیدنت عفونی
بیمارستان امام رضا (ع) - گروه میکروب شناسی

تاریخ دریافت:۸۳/٦/٥ - تاریخ پذیرش:۸۳/۱۲/۹

خلاصه

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین[۱]، از جمله علل اصلی عفونتهای بیمارستانی در دنیا هستند و درمان عفونت حاصل از این باکتری به علت مقاومت چند دارویی مشکل است. بنابراین تشخیص دقیق این باکتری از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی روش مناسب جهت تشخیص استافیلوکوکهای مقاوم به متی سیلین بوده است.

روش کار: این پژوهش توصیفی در سال ۸۲ در بیمارستان های امام رضا (ع) و قائم (عج) مشهد انجام گردیده است. در این مطالعه ۸۶ سوش استافیلوکوکوس اورئوس جهت تعیین مقاومت به متی سیلین از طریق روشهای فنوتیپیک و بررسی ژن mecA مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق بررسی ژن mecA به روش PCR [۲] به عنوان روش استاندار در نظر گرفته شد و دو روش فنوتیپیک دیسک دیفیوژن و Etest با آن سنجیده شدند. آزمایش PCR به صورت Multiplex PCR انجام شد و علاوه بر ژن mecA ژن 16S rRNA نیز تکثیر گردید و از آن به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. اطلاعات بدست آمده با استفاده از آمار توصیفی پردازش گردید.

نتایج: ۴۶ سوش مقاومت به متی سیلین و ۴۰ سوش حساسیت به متی سیلین را نشان دادند. نتایج حاصل از Etest ۱۰۰٪ با PCR منطبق بوده ولی نتایج حاصل از دیسک اگزاسیلین تنها ۴۳/۸٪ با PCR مشابهت داشتند. نتایج بدست آمده از روش دیسک دیفیوژن برای دیگر آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این تحقیق به قرار زیر است: در سوشهای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مقاومت به اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلوگزاسیلین و سفوتاکسیم در مقایسه با سوشهای استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین[۳] بیشتر مشاهده گردید.

نتیجه گیری : نتایج نشان داد PCR و Etest از حساسیت و اختصاصیت مشابه برخوردار بوده و بهترین راه برای تشخیص استافیلوکوکهای مقاوم به متی سیلین می باشند.

واژه های کلیدی: PCR, Etest, mecA ، دیسک دیفیوژن، اگزاسیلین، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ، استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین

[1] Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)
[2] Polymerase chain reaction
[3]Methicillin sensitive Staphylococcus aureus (MSSA)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در زمره علل اصلی عفونتهای بیمارستانی در دنیا هستند و دارای دامنه وسیعی از مقاومت به آنتی بیوتیک ها می باشند که حق انتخاب درمانی رابه وانکومایسین و تیکوپلانین محدود می نماید.

نه تنها درمان MRSA ها به علت مقاومت چند دارویی مشکل است، بلکه تشخیص این مقاومت نیز به علت بیان غیر یکنواخت آن باعث ایجاد اشتباه در تست های حساسیت معمول می گردد.

بنابراین برای درمان بیماران و کنترل عفونت در بیمارستانها تشخیص سریع و دقیق ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از اهمیت بالایی برخوردار است.

درروش های فنوتیپیک برای تشخیص ایزوله‌های MRSA نتایج بیش از ۲۴ ساعت پس از تهیه کلنی خالص از ارگانیسم بدست می آید و در بعضی مواقع نیز تفسیر نتایج آزمایشات با دشواری انجام می گیرد.

سطوح بیان مقاومت در روش های فنوتیپیک برای تشخیص MRSA، وابسته به کنتیک القا پروتئین اتصالی به پنی سیلین[4] (PBP2')، سابقه ژنتیکی گونه و فاکتوررهای خارجی مانند دما، قدرت یونی، غلظت نمک، طول مدت انکوباسیون و pH محیط کشت می باشد از آنجا که به طور اولیه PBP2' که توسط ژن mecA تولید می شود نقش اصلی در ایجاد مقاومت به متی سیلین را دارد، امروزه برای تشخیص MRSA ها از تکنیک های مولکولی مانند PCR برای بررسی ژن mecA استفاده می شود (۱،۲).

در این تحقیق با هدف بررسی سه روش دیسک دیفیوژن، Etest و PCR ژن mecA در تعیین مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس‌نسبت به متی سیلین ارزیابی و مقایسه گردید و بر اساس نتایج، Etest و PCR از اختصاصیت و حساسیت مشابه برخوردار بودند.

روش کار

این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۲ در بیمارستان های امام رضا (ع) و قائم (عج) مشهد انجام گردیده است. ۸۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از ۸۶ بیمار در بخشهای عفونی و سوختگی در بیمارستان امام رضا(ع) و بخشهای مختلف بیمارستان قائم (عج) جدا و تشخیص داده شدند. سوشهای جداسازی شده در محیط نوترین آگار درون لوله های درب دار کشت داده شده و در دمای ^{oC} ۴ در یخچال نگهداری شدند. به‌عنوان‌سوش کنترل مثبت از یک سوش استافیلوکوکوس اورئوس که حداقل غلظت ممانعت کننده[5] بیشتر از μg/ml ۲۵۶ را نشان داد استفاده شد و سوش کنترل منفی ATCC 29213 بود.

برای تعیین MIC اگزاسیلین در سوشهای جدا شده، از سوسپانسیون هر یک از سوشها غلظت ۰/۵مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده (بدون افزودن NaCl) و یک نوار Etest اگزاسیلین[6] بر روی آن قرارداده و پلیت در حرارت ^{oC} ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

برای انجام دیسک دیفیوژن نیز از سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده (بدون افزودنNaCl) و دیسک آنتی بیوتیک اگزاسیلین ۱μg به همراه دیسکهای آنتی بیوتیک پنی سیلین ۱۰u، آمپی سیلین ۱۰μg، وانکومای‌سین ۳۰μg، اریترومایسین μg ۱۵، سفالوتین ۳۰μg، سیپروفلوکساسین ۵μg، کلوگزاسیلین ۵μg، سفوتاکسیم μg ۳۰ (پادتن طب، ایران) بر روی محیط قرار داده و پلیت در حرارت ^{oC} ۳۵ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

ابتدا DNA سوشهای استافیلوکوکوس ایزوله شده توسط لیز از طریق جوشاندن آماده شد. ۳ تا ۶ کلنی از محیط خون دار که مدت یک شب انکوبه شده بود، انتحاب شدند و به ml ۲ از محلول بافر سالین فسفات (PBS) استریل منتقل شدند، به طوری که کدورت ۰/۵ مک فارلند ایجاد گردد. ml ۱/۵ از آن در g ۱۳۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد. بر روی سلولهای

[4] Penicillin binding Pritein2'

[5] Minimal inhibition concenteration

[6] AB Biodisk, Sweden, نوار اگزاسیلین متعلق به شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

ته نشین شده ۲۰۰µl بافر لیز کننده شامل Triton X-100 %1, 10 mM Tris-HCl (PH 8), 1mM EDTA ریخته شد و ۱۰ دقیقه در حمام ^{C} ۱۰۰° قرار داده شد، بعد از سه دقیقه در ۱۳۰۰۰گرم سانتریفوژ کرده، مایع رویی حاوی DNA الگو می باشد. این مایع را می توان در ^{oC}۲۰- نگهداری کرد.

سکانس پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر ژن 16SrRNA و mecA:

سکانس پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن 16S rRNA استافیلوکوکوس شامل:

387F 5'-CGT AAG CCT GAC GGA GCA 16 S AC-3'
S 914R 5'-AAC CTT GCG GTC GTA 16 CTC CC-3'

و سکانس پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن mecA،

mec 449F 5'-AAA CTA CGG TAA CAT TGA TCG CAA C-3'
mec 761R 5'-CTT GTA CCC AAT TTT GAT CCA TTT G-3'

بودند. ژن16SrRNAبه‌عنوان کنترل داخلی در Multiplex PCR استفاده شد.

واکنش PCR شامل 200 µMdeoxynucleotide triphosphates, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 U/20µl Taq polymerase, 100 mMTris-HCl PH=8, 10 ng/µl Target DNA, 1X (500 mMKCl) buffer می باشد که حجم نهایی هر واکنش ۲۰ µl بود. سیکلهای حرارتی برای انجام واکنشهای PCR به صورت ۳۰ سیکل شامل ^{oC} ۹۵ برای ۳۰s، ^{oC}۶۲ برای ۳۰s ، ^{oC} ۷۲ برای ۳۰s بود. در ژل آگارز ۱/۷٪ و اتیدیوم بروماید محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفتند که در نتیجه یک قطعه bp ۵۲۸ از 16SrRNA و یک قطعه ۳۱۵bp از ژن mecA تکثیر شدند. در این آزمایشات جهت اندازه گیری قطعات ژن حاصل از PCR در روی ژل از مارکر وزن مولکولی DNA Ladder 1000bp استفاده شد. در نهایت محصولات PCR با آنزیم های برش دهنده NdeI (قادر به برش هر دو قطعه تکثیر شده از PCR می باشد) وEcoRI (جهت برش قطعه تکثیر شده از ژن 16 S rRNA) به مدت ۳ ساعت در دمای ^{oC}۳۷ مورد هضم قرار گرفتند و محصولات حاصل از هضم در ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ بررسی شدند. سپس ژلها جهت بررسی باندهای ایجاد شده توسط نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. جهت اندازه گیری قطعات حاصل از هضم آنزیمی از مارکر وزن مولکولیDNA Ladder 1000bp استفاده شد.

اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی پردازش گردیده است.

نتایج

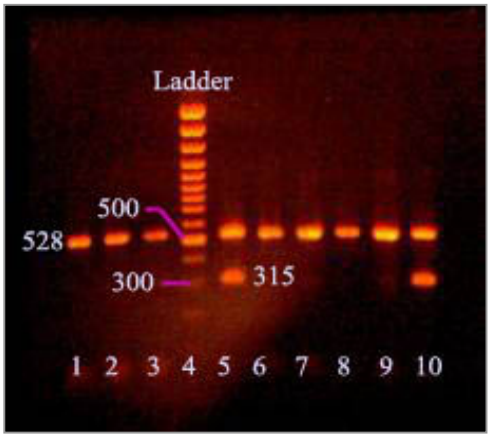
سوشهای مورد آزمایش از بیمارستان قائم (عج) و بیمارستان امام رضا (ع) جدا شده بودند، که ۲۸ سوش از بیمارستان قائم (عج)، ۳۰ سوش از بخش عفونی بیمارستان امام رضا (ع) و ۲۸ سوش دیگر از بخش سوختگی بیمارستان امام رضا (ع) جدا شده بودند. در این آزمایشات ۸۶ سوش استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفته، که ۴۱ سوش از نمونه زخم، ۲۲ سوش از نمونه خون، از نمونه های ادرار و ترشحات چشم هر کدام ۶ سوش، از نمونه های حلق ، ریه ، بینی و مدفوع هر کدام ۲ سوش و از نمونه های مایع مفصل، مایع نخاع و مایع دیالیز صفاقی هر کدام ۱ سوش جدا شده بودند. در کل این ۸۶ سوش ایزوله شده ، ۴۶ مورد مقاومت و ۴۰ مورد حساسیت به متی سیلین را در روش های PCR و Etest نشان دادند. تمام سوشهایی که توسط آزمایشات بیوشیمیایی استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده بودند باروش PCR ژن 16SrRNA نیز تأیید شدند.

از ۲۸ نمونه بیمارستان قائم (عج) با استفاده از آزمایش PCR، ۷ مورد (۲۵٪) مقاوم به متی سیلین و ۲۱ مورد (۷۵٪) حساس به متی سی‌لین بودند (شکل ۱).

از ۲۸ نمونه بخش سوختگی بیمارستان امام رضا (ع) با استفاده‌از آزمایش PCR ۲۶ مورد (۹۲/۹٪) مقاوم به متی‌سیلین و ۲ مورد (۷/۱٪) حساس به متی سیلین بودند (شکل ۲).

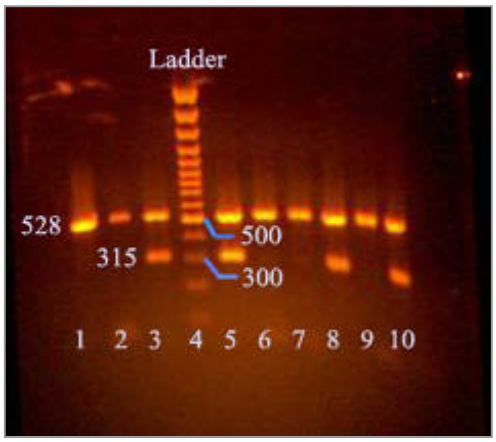
www.SID.ir

Archive of SID



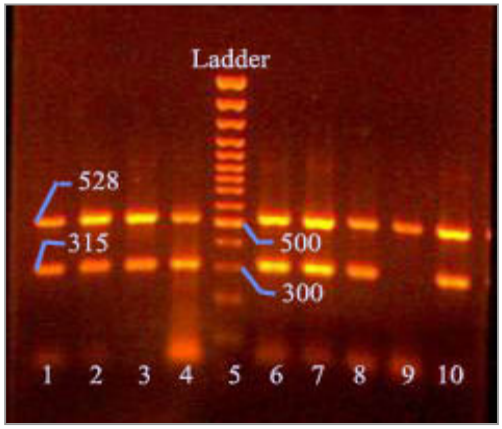
شکل ۱- نتایج PCR مربوط به برخی از نمونه های کلینیکی بیمارستان قائم(عج)

در تمام نمونه ها ژن 16S rRNA که ۵۲۸ bp وزن دارد تکثیر شده است ولی تنها در ردیفهای ۱ و ۶ ژن mecA نیز تکثیر یافته است که وزنی حدود ۳۱۵ bp دارد.



شکل ۲ – نتایج PCR مربوط به برخی از نمونه های کلینیکی بیمارستان امام رضا (ع) . در تمام نمونه ها ژن 16S rRNA که ۵۲۸ bp وزن دارد تکثیر شده است ولی تنها در ردیف های ۳ و۵ و۸ و ۱۰ ژن mecA نیز تکثیر یافته است که وزنی حدود ۳۱۵ bp دارد.

از ۳۰ نمونه بخش های بیمارستان امام رضا (ع) با استفاده از آزمایش PCR ۱۳ مورد (۴۳/۳٪) مقاوم به متی سیلین و ۱۷ مورد (۵۶/۷٪) حساس به متی سیلین بودند (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج PCR مربوط به برخی از نمونه های کلینیکی بخش سوختگی بیمارستان امام رضا (ع)

در تمام نمونه ها ژن 16S rRNA که ۵۲۸ bp وزن دارد تکثیر شده است و در تمام نمونه ها نیز بجز نمونه ردیف ۹ ژن mecA نیز تکثیر یافته است که وزنی حدود ۳۱۵ bp دارد.

در این تحقیق روش PCR به عنوان روش استاندارد در نظر گرفته شد و روشهای دیسک اگزاسیلین و Etest با PCR مقایسه شدند. نتایج حاصل از PCR وEtest نشان می دهد که تطابق کامل نتایج بین این دو روش برای تعیین مقاومت به متی سیلین وجود دارد، بطوریکه دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ می باشند. نتایج حاصل از استفاده دیسک اگزاسیلین ارتباط ۴۳/۸٪ را با روش PCR و Etest نشان داد. تمام ۴۶ سوشی که مقاومت به متی سیلین را از طریق PCR و Etest نشان داده بودند، در متد دیسک دیفیوژن نیز مقاومت به دیسک اگزاسیلین مشاهده شد ولی نمونه های MSSA موارد مثبت کاذب (مقاوم به متی سیلین) در متد دیسک را نشان دادند. از ۴۰ سوشی که حساسیت به متی سیلین را در متدPCR و Etest نشان دادند تنها در ۱۱ مورد (۱۲/۸٪) حساسیت توسط متد دیسک نیز تایید شد و ۲۶ مورد (۳۰/۲٪) مقاومت و ۳ مورد (۳/۵٪) مقاومت سطح پایین را در روش دیسک دیفیوژن نشان دادند (جدول شماره ۱). حساسیت و اختصاصیت این تست در مقایسه با PCR به ترتیب ۱۰۰٪ و ۲۷/۵٪ بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه روش دیسک و Etest و Polymerase chain reaction

گروه	تعداد	درصد
مقاوم با روش دیسک و Etest و PCR	۴۶	۵۳/۵
حساس با روش دیسک و Etest و PCR	۱۱	۱۲/۷۹
حد واسط با روش دیسک و حساس با روش Etest و PCR	۳	۳/۴۹
مقاوم با روش دیسک و حساس با روش Etest و PCR	۲۶	۳۰/۲۳
جمع	۸۶	۱۰۰

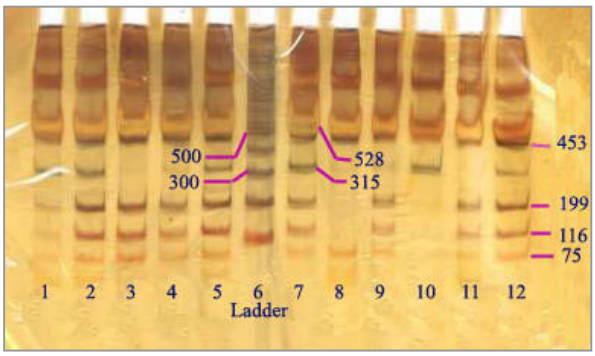
نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن برای دیگر آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این تحقیق به قرار زیر است:

در کل سوشهای ایزوله شده، ۹۸/۸٪ مقاوم به پنی سیلین، ۹۷/۷٪ مقاوم به آمپی سیلین، ۵۱/۱٪ مقاوم به سفالوتین، ۵۰٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۵۱/۲٪ مقاوم به کلوگزاسیلین، ۵۲/۳٪ مقاوم به اریترومایسین و ۵۱/۲٪ مقاوم به سفوتاکسیم بودند. در هیچ یک از نمونه های ایزوله شده مقاومت به وانکومایسین مشاهده نشد. در سوشهای MRSA، ۹۵/۷٪ مقاومت به اریترومایسین، ۹۱/۳٪مقاومت به سیپروفلوکساسین، ۹۵/۷٪ مقاومت به کلوگزاسیلین و ۹۵/۷٪ مقاومت به سفوتاکسیم مشاهده شد.

در سوشهای MSSA، ۶۲/۵٪ حساسیت به اریترومایسین، ۹۲/۵٪ حساسیت به سیپروفلوکساسین، ۹۷/۵٪ حساسیت به کلوگزاسیلین و ۸۵/۳٪ حساسیت به سفوتاکسیم را نشان دادند.

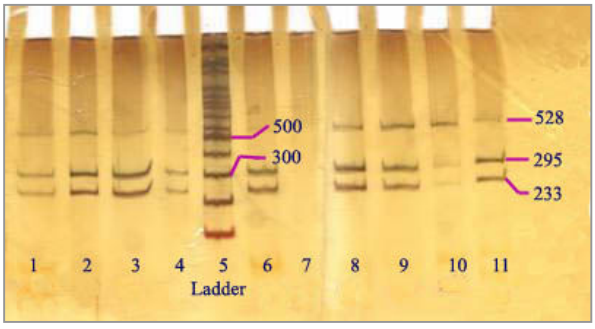
نتایج حاصل از RFLP-PCR در نمونه هایی که از آنزیم NdeI استفاده شده است، نشان می دهد که در تمام نمونه های مورد آزمایش برش ها در مناطق مورد نظر در دو قطعه تکثیری مختلف از دو ژن مجزا 16S rRNA و mecA ایجاد گردیدند و قطعات ۱۹۹bp، ۱۱۶bp، ۷۵bp و ۴۵۳bp تولید شدند، و هیچ پلی مرفیسمی در قطعه تکثیری ۳۱۵ bp، mecA دیده نشد.

قطعه تکثیری ۵۲۸bp به دو قطعه ۷۵bp و ۴۵۳ bp شکسته شده و قطعه تکثیری ۳۱۵ bp به دو قطعه ۱۹۹ bp و ۷۵ bp شکسته شدند (شکل ۴).



شکل ٤ - شکل نتایج حاصل از هضم آنزیم NdeI را نشان می دهد. تمام نمونه ها دارای قطعه ۵۲۸ bp بوده که به دو قطعه ۴۵۳ bp و ۷۵ bp شکسته شده اند . تمام نمونه ها (به جز نمونه شماره ۸) دارای قطعه ۳۱۵ bp بوده که به دو قطعه ۱۹۹ bp و ۱۱۶ bp شکسته شده اند

نتایج حاصل از RFLP-PCR در نمونه هایی که از آنزیم EcoRI برای ایجاد برش در آنها استفاده شده بود، در تمام نمونه های مورد آزمایش برش در محل مورد نظر ایجاد گردید، و دو قطعه ۲۹۵bp و ۲۳۳bp ایجاد نمود. در تمام موارد مورد آزمایش قطعات مورد نظر، که حاصل از قطعه ۵۲۸bp تکثیر شده از ژن 16S rRNA توسط PCR می باشند مشاهده گردیدند (شکل ۵).



شکل ۵- نتایج حاصل از هضم آنزیم EcoRI در شکل نشان داده شده است. تمام نمونه ها (به جز نمونه شماره ۷ که شاهد منفی) دارای قطعه ۵۲۸ bp بوده که به دو قطعه ۲۹۵ bp و ۲۳۳ bp شکسته شده اند

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس از مهمترین پاتوژنهای انسانی است و در زمره علل اصلی عفونتهای بیمارستانی در دنیا است (۳،٤). گونه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در سال ۱۹۶۱، فورا بعد از مصرف این آنتی بیوتیک در درمان عفونتهای استافیلوکوکوس اورئوس شناسائی شدند (۵،٦). این گونه ها دارای ژن mecA ،۲ kb می باشند، که روی یک عنصر ۳۲ تا ۶۰kbp قرار دارد. این عنصر mec الل مشابهی در گونه های حساس ندارد و به این علت شناسایی آن در یک سوش استافیلوکوکوس اورئوس نشانه مقاومت آن به متی سیلین یا اگزاسیلین است (۵،٦).

متدهای معمول که توسط NCCLs برای تشخیص MRSA از MSSA توضیح داده شده اند، مانند دیسک دیفیوژن اگزاسیلین و غربالگری روی آگار، در بعضی مواقع مشکلاتی در تفسیر نتایج بدست آمده، ایجاد می کنند. این متدها اغلب به آهستگی انجام می گیرند و زیاد دقیق نمی باشند. بر این اساس اغلب متدهایی که روی تشخیص PBP2' یا ژن mecA پایه گذاری شده مناسب تر به نظر می رسند. بنابراین وجود ژن mecA حتی اگر آزمایشات فنوتیپیک حساسیت سوش مورد نظر به اگزاسیلین را نشان دهند، دلیل قطعی بر مقاومت به متی سیلین است و به این علت است که روش PCR برای شناسایی اختصاصی MRSAها از طریق تکثیر ژن mecA به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته می شود (۷).

استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین، که مقاومت به چندین آنتی بیوتیک دیگر و فلزات سنگین نیز دارند توانایی مناسبی برای کلونیزه شدن موفق و بقاء در بیمارستانها را دارا می باشند، که این توانایی را، از طریق قدرت کسب ژنهای مناسب از ارگانیسمهای گوناگون بدست می آورند.

استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین افزایش پایداری را هر ساله در درصد ایزوله های استافیلوکوکها در اکثر بیمارستانها در کشورهای مختلف نشان می دهند، مثلا در امریکا یک روند رو به افزایش وجود دارد، و تقریباً ۲۵٪ از همه ایزوله های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس را در سال ۲۰۰۰ شامل می گردید (۸). این وضعیت در کشورهایی که یک سیستم مراقبت بیمارستانی را دارند، تحت کنترل بیشتری است ولی در کشورهای فاقد این سیستم مراقبتی، مانند کشور ما درصد بالاتری برای شیوع MRSA در ایزوله های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد (۹).

با توجه به این حقیقت که گونه‌هایMRSA تنها حساسیت به گلیکوپپتیدها دارند، مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان کلیه عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس می تواند عواقب خطرناکی بدنبال داشته باشد، که شامل ایجاد آنتروکوکهای مقاوم به وانکوماسین، و خطر تولید گونه های مقاوم به وانکوماسین در نژادهای MRSA می باشد (۱۰).

در این رابطه می توان ذکر کرد که تعداد آنتروکوکهای مقاوم به وانکوماسین از ۱۹۸۷ تاکنون در ICU های امریکا ۲۵ برابر شده اند (۱۰).

بنابراین برای کنترل عفونتهای بیمارستانی، درمان بیماران با عفونتهای شدید و جلوگیری از مرگ و میر در این بیماران باید یک متد سریع و قابل اعتماد برای شناسایی MRSA در اختیار داشته باشیم، متد تکثیر قطعه ای از ژن mecA به طریق PCR که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت قابل اعتماد تر، در دسترس تر، با مصرف هزینه کمتر و نسبتا سریعتر می باشد.

هدف اصلی در این مطالعه تشخیص دقیق استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین از طریق PCR ژن mecA می باشد که به صورت Multiplex PCR بر روی ۸۶ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، و دو ژن16S rRNA و mecA تکثیر گردیدند، در این تحقیق ژن 16S rRNA به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد، که در تمام نمونه های استاف وجود دارد و یک باند ۵۲۸bp را ایجاد می نماید. عدم حضور این باند نشانه اختلالی در انجام PCR یا مواد موجود در آن و به طور کلی عدم کارکرد روش PCR است، یانشان دهنده وجود میکروبی غیر از جنس استافیلوکوکوس می باشد و حضور قطعه تکثیر شده ژن mecA که ۳۱۵bp می باشد نشانه مقاومت میکروب استافیلوکوکیلوکوکوس به متی سیلین است و

www.SID.ir

Archive of SID

عدم حضور آن نشانه حساسیت میکروب استافیلوکوکیلوکوکوس به آنتی بیوتیک متی سیلین می باشد.

از ۸۶ نمونه مورد بررسی، در تمام موارد قطعه ۵۲۸bp تکثیر شد، ولی قطعه ۳۱۵bp که مقاومت به متی سیلین را نشان می دهد، در ۵۳/۵٪ از کل ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مشاهده شد(MRSA) و ۴۶/۵٪ حساسیت به متی سیلین را نشان دادند(MSSA). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۱ در کانادا انجام گرفت از کل ۳۰۹ ایزوله استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس که توسط متد PCR مورد سنجش قرار گرفتند، ۲۱۳ (۶۸/۹٪) مورد به عنوان MRSA و ۹۶ (۳۱/۱٪) مورد به عنوان MSSA شناسایی شدند (۱۱). در تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ در زوریخ انجام گرفت، از ۹۱ ایزوله استافیلوکوک اورئوس ۴۶ (۵۰/۶٪) مورد دارای ژن mecA بودند و۴۵ (۴۹/۴٪) مورد عدم حضور ژن mecA را نشان دادند (۱۲). در تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ در استرالیا بر روی ۹۰ ایزوله استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت ۶۰ (۶۶/۶٪) مورد MRSA و ۳۰ (۳۳/۳٪) مورد MSSA گزارش گردید (۱۳). در تحقیقی که در سال ۲۰۰۰ در کبک کانادا بر روی ۲۰۶ ایزوله استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، مقایسه ای بین متد های معمول و متد PCR، نشان داد که در مورد مقاومت به اگزاسیلین و حضور ژن mecA ارتباط ۹۸٪ است. ۶۸٪ از گونه های ایزوله شده بطور فنوتیپیک حساسیت به اگزاسیلین را به نمایش گذاشتند، در این میان یک ایزوله با فنوتیپ حساس دارای ژن mecA بود و از ۳۲٪ باقیمانده که به طور فنوتیپیک مقاوم بودند، ۴ مورد فاقد ژن mecA گزارش شدند (۱۳).

در تحقیق حاضر بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان امام رضا (ع)، سایر بخش های بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان قائم (عج) مورد بررسی قرار گرفتند که با روش PCR و یا Etest بترتیب در صد مقاومت به متی سیلین در سه مرکز ۹۲/۹٪, ۴۳/۳٪ و ۲۵٪ بود. اختلاف بین درصد فراوانی ژن mecA، در بین بیماران بخش های مختلف بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان قائم (عج) را می توان به علت وجود بخش سوختگی در بیمارستان امام رضا (ع) عنوان نمود که می تواند به عنوان یک کانون آلودگی برای MRSA ها باشد که احتمالا توسط پرسنل و بیماران این بخش به بخشهای دیگر بیمارستان امام رضا (ع) منتقل می گردد، و احتمال کلونیزاسیون و ایجاد عفونت بیماران در دیگر بخش های بیمارستان را با MRSA افزایش می دهند.

بعد از انجام مراحل PCR و الکتروفورز نمونه ها و مشاهده باندهای ۵۲۸bp و ۳۱۵bp برای تأیید اینکه قطعاتی از ژنهای مورد نظر در طی پروسه PCR تکثیر شده اند یا خیر، و همچنین برای بررسی وجود یا عدم وجود پلی مرفیسم در بین نژادهای MRSA در مورد ژن mecA و ژن 16S rRNA، در ۶۱ مورد از محصولات PCR سوشهای استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده، آنزیم های برش دهنده EcoRI و NdeI استفاده شدند. در کل ۶۱ نمونه ای که تحت تاثیر آنزیم قرار گرفتند، در هیچ یک از موارد پلی مرفیسم مشاهده نگردید و تمام قطعات مورد نظر در ژل پلی آکریل آمید مشاهده شدند. این نشان می دهد که ژنهای mecA و 16S rRNA در سوشهای ایزوله شده فاقد پلی مرفیسم در محل های اثر آنزیم برش دهنده اند و یا فاقد قطعات حذفی در تکه تکثیر شده هستند و این قطعات تکثیر شده در این سوشها یکسان اند (۱۴و ۱۵). برای تشخیص پلی مرفیسم در این قطعات تکثیری بهتر است، سوشهای استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس از مناطق جغرافیایی دورتر ایزوله گردند تا احتمال مشاهده پلی مرفیسم و تفاوتها در آنها بیشتر گردد.

در تحقیقی که در امریکا درسال ۱۹۹۸ انجام گرفت ۸۰ نمونه MRSA از سه بیمارستان دانشگاهی ایزوله شدند و تکنیک PCR تکثیر ژن mecA در آنها انجام گرفت و تحت سه آنزیم برش دهنده Nde-I و Cla-I و Dra-I قرار گرفتند. در این نمونه ها نیز هیچ پلی مرفیسمی در ژن mecA دیده نشد. در کنار انجام PCR، دو روش تشخیص فنوتیپیک دیسک دیفیوژن و تعیین مقدار MIC از طریق روش Etest نیز برای شناسایی سوشهای MRSA انجام گرفت، که نتایج حاصل از Etest و PCR به میزان ۱۰۰٪ یکسان بودند (۱۴).

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۲ در برزیل انجام گرفت، از ۴۱ ایزوله استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس ۱۴ موردMRSA تشخیص داده شدند. در این مطالعه روش Etest در مقایسه با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت ، که ۱۰۰٪ توافق با متد PCR را نشان داد (۱۵).

در مطالعه حاضر در انجام تست دیسک دیفیوژن، وقتی از دیسک اگزاسیلین برای تعیین مقاومت، حساسیت یا مقاومت حد وسط استفاده شد، نتایج این تست تنها ۴۳/۸٪ با نتایج حاصل از PCR و Etest توافق داشت. تمام ایزوله هایی که در روش دیسک حساسیت را نشان می دادند فاقد ژن mecA بودند ولی موارد مثبت کاذب در میان ایزوله های MSSA به میزان ۷۲/۵٪ در متد دیسک دیفیوژن مشاهده گردید. این نتایج نامناسبی که در این بررسی از روش دیسک دیفیوژن بدست آمد، بیشتر در ارتباط با عدم کارایی و استاندارد نبودن دیسکهای اگزاسیلین و یا عدم مراقبت از دیسکهای اگزاسیلین در هنگام حمل و نقل می باشد. زیرا در مقایسه با نتایجی که از تحقیقاتی که بر روی میزان دقت متد استفاده از دیسک در مقایسه با روش PCR در کشورهای دیگر بدست آمده، این متد همخوانی بیشتری را با متد PCR در مقایسه با این تحقیق را نشان می دهد. در تحقیقی که در هند درسال ۲۰۰۰ بر روی ۱۰۶ سوش استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس انجام شد ۵۷ مورد MRSA و ۵۹ مورد MSSA تشخیص داده شدند. در این مطالعه نیز متد PCR بعنوان روش استاندارد طلایی در نظر گرفته شد و متد های دیگر فنوتیپیک با آن سنجیده شدند، که در مورد دیسک دیفیوژن حساسیت، اختصاصیت و دقت به ترتیب ۸۷/۷٪، ۸۹/۸٪ و ۸۸/۷٪ بدست آمدند (۱۶)، ولی در تحقیق حاضر که با روش دیسک دیفیوژن انجام شده نتایج به ترتیب ۱۰۰٪، ۲۷/۵٪ و ۶۱/۳۳٪ بدست آمد . در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۱ در مصر انجام گرفت از ۲۵۰ ایزوله استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس مختلف، ۳۷ مورد MRSA بودند و تمام این موارد توسط تست تعیین MIC نتایج مشابهی داشتند. در متد دیسک دیفیوژن که در این تحقیق بکار گرفته شد، از ۳۷ مورد MRSA، ۷ مورد حساسیت به دیسک اگزاسیلین نشان می دادند و از ۲۱۳ مورد MSSA ، ۱۳ مورد مقاومت کاذب به دیسک را به نمایش گذاشتند (۱۷).

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۹ بر روی ۹۹ سوش استافیلوکوکیلوکوکوس انجام گرفت ۲۴ مورد از ایزوله ها توسط متد PCR که متد مرجع در نظر گرفته شد، به عنوان MSSA و ۱۷ مورد به عنوان MRSA بودند. در این تحقیق این نتایج به طور کامل با متد دیسک دیفیوژن تطابق داشت (۱۸).

تعیین MIC از طریق Etest یک روش بسیار دقیق است و تنها مشکل آن در مقایسه با PCR زمان طولانی تر آن می باشد، زمان لازم برای تعیین MIC از طریق Etest حداقل ۲۷ ساعت می باشد (۳ساعت برای ایجاد کدورت جهت شیرابه میکروبی و ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت حاوی میکروب و نوار Etest)، در حالیکه زمان لازم برای PCR حدود ۳ ساعت است. (۳۰ دقیقه استخراج DNA ، ۲ساعت PCR ، ۳۰ دقیقه انجام الکتروفورز نمونه در ژل آگاروز).

در کنار دیسک اگزاسیلین از دیسکهای دیگری برای تعیین حساسیت ، مقاومت سوش ایزوله شده نیز استفاده شد، اطلاعات بدست آمده تأییدی بر یافته های قبلی است که اکثریت سوشها MRSA دارای مقاومت چند دارویی هستند و عنصر ژنی mec علاوه بر ژن mecA که مقاومت به اگزاسیلین را حمل می‌نماید، می تواند حامل ژنهای مقاومت به دیگر آنتی بیوتیک ها نیز باشد (۱۷،۲۰). در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۲ در امریکا بر روی ۴۳ سوش استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام گرفت، ۸۸٪ مقاومت به اریترومایسین،۶۱٪ مقاومت به کلیندامایسین، ۷۷٪ مقاومت به سیپروفلوکساسین و ۷۴٪ مقاومت به موکسی فلوکساسین را نشان دادند.

همچنین در این مطالعه کاهش حساسیت به اریترومایسین، کلیندامابسین، سیپروفلوکساسین و لووفلوکساسین نیز مشاهده گردید، ولی هیچ سوش MRSA،دارای مقاومت به وانکومایسین و کوئینوپریستین ، دالفوپریستین مشاهده نشد (۲۰). در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۹ در آمریکا، کانادا و آمریکای لاتین بر روی ۳۹۵ سوش استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس مقاوم به

www.SID.ir

Archive of SID

متی سیلین انجام گرفت، کاهش حساسیت به اریترومایسین (۴/۶٪)، کلیندامایسین(۲۱/۸٪) و سیپروفلوکساسین (۱۰/۶٪) مشاهده شد (۱۹،۲۰).

با راه اندازی یک روش استاندارد طلایی برای شناسایی استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین می توان با تشخیص سریع و دقیق این میکروب درمان سریع با آنتی بیوتیک را شروع و از مصرف بی رویه وانکومایسین جلوگیری نمود، این مصرف بی رویه وانکومایسین می تواند عواقب خطرناکی در زمینه ایجاد سوشهای مقاوم به گلیکوپپتیدها در پی داشته باشد با استفاده از متد PCR می توانیم میزان دقیق فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین را شناسایی کرد.

در این تحقیق در کنار انجام تست PCR از اندازه گیری مقدار MIC اگزاسیلین برای سوشهای ایزوله شده به روش Etest نیز استفاده شد که دارای نتایج مشابه با PCR بود.

در این بررسی در هیچ یک از ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت سطح پایین به وانکومایسین مشاهده نگردید.

انجام تست دیسک دیفیوژن برای آنتی بیوتیک اگزاسیلین در مقایسه با نتایج حاصل از Etest و PCR روش قابل اعتمادی نیست و نتایج مقاومت کاذب زیادی نشان داد که این نتایج مقاومت کاذب احتمالًا بیشتر در ارتباط با عدم کارایی و استاندارد نبودن دیسکهای اگزاسیلین و یا عدم مراقبت از دیسکهای اگزاسیلین در هنگام حمل و نقل می باشد. بنابراین استفاده از روش دیسک دیفیوژن به عنوان تنها روشی که در آزمایشگاه های بیمارستان امام رضا (ع) و بیمارستان قائم (عج) انجام می شود برای شناسایی و تمایز MRSA و MSSA آزمایش قابل اعتمادی نمی باشد.

با استفاده از آنزیم های برش دهنده بر روی محصولات PCR هیچ نوع پلی مرفیسم یا حذفی در قطعه تکثیر یافته از ژن mecA مشاهده نگردید که این می تواند تأییدی بر این نکته باشد که MRSA های جمع آوری شده در این تحقیق دارای یک منشاء کلونال هستند.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی با عنوان "تعیین اختصاصی استافیلوکوکیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از طریق PCR ژن mecA " است که با شماره ۸۲۰۳ در تاریخ ۸۲/۳/۲۱ از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به تصویب رسیده است . لذا بدین وسیله از آن معاونت محترم و شورای محترم پژوهشی دانشگاه تشکر می گردد.

****

References:

1- Betty A., Forbes Danicl F., Sahm A., Weissfeld S.: Diagnostic Microbiology, 11th ed, 2002; Chapter 12. 618.

2- Hiramatsu K., Katayama Y.: Molecular genetics of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Int. J. med. Microbiol, 2002; 2:67-73.

3- Rowe F., Superti S.V., Scheibe R.M.: Agar diffusion, agar dilution, Etest, and agar screening test in the detection of methicillin resistant in staphylococci. Diag. Microbiol. Infect. Dis, 2002; 43:45-48.

4- Haddadin A.S., Fappiano S.A., Lipsett P.A.: Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the intensive care unit. Postgraduate. Med. J. 2002; 78:385-392.

5- Berger-Bachi B.: Genetic basic of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Cell. Mol. Life. Sic. 1999; 65: 764-770.

www.SID.ir

Archive of SID

6- Prasad K.N., Kumar R., Tiwari D.P.: Comparison of various conventional methods with a polymerase chain reaction assay for detection methicillin resistant & susceptible Staphylococcus aureus strains. Indian J. Med. Res.2002; 112:198-201.
7- Martineau F., Picard J.F., Lansac N., Nenard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G.: Correction between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob. Agents Chemother, 2002; 44: 231-238.
8- Jaffe R.I., Lane J.D., Albury S.V., Niemeyer D.M.: Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin resistant staphylococci use the PCR. J. Clinic. Microbiol, 2002; 38:340-342.
9- Aires de Sousa M., Sonatos Sonches I., Ferro M.L.: J. Clinic. Microbiol, 1998; 9:2590-2596.
10- Narinder K.: Rapid test methods for the detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Anti. Infect. Dis. Newlett, 1997; 8:62-63.
11- Arbique J., Forward K., Haldane D., Davidson R.: Comparison of the velogene MRSA ID system for rapid identification of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Diag. Microbiol. Infect. Dis, 2001; 40:5-10.
12- Rohrer S., Tschierske M., Zbinden R., Berger-Bachi B.: Improved method for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 2001; 20:297-270.
13- Merlino J., Watson J., Rose B.: Detection and expression of methicillin resistant Staphylococcus aureus in central Sydney, Australia. J. Antimicrob. Chemother, 2002; 49:793-801.
14- Ahmadinejad M., Snyder J.W., Perlin M.H.: A combined molecular approach to screen for mec A gene variants from methicillin resistant Staphylococcus aureus. Diag. Microbiol. Infect. Dis, 1998; 30:17-20.
15- Kreiswirth, B., Komblum, L., Arbeit, R.D.: Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in S. aureus. Science, 1998; 259:227-230.
16- Prasad K.N., Tiwari D.P., Mishra K.K., Ayyagari A.: Comparison of various conventional methods with a polymerase chain reaction assay for detecting methicillin resistant & susceptible Staphylococcus aureus strain. Indian J. Med. Res. New Delhi, 2000; 112:198-201.
17- Petinaki E., Miriagou V., Tzourelekis L.S., et al.: Methicillin resistant Staphylococcus aureus in the hospital of center Greece. Int. J. Antimicrob. Agents, 2001; 18:61-65.
18- Kohner P., UheJ., Kolbert C., Persing D., Cickerill F.: Comparison of susceptibility tencity method with mec A gene analysis for detection oxacillin (methicillin) resisitance in clinical isolates of staphiloccous aureus and coagulase negative staphiloccous spp. J. Clin .Microbiol , 1999; 37: 2952 -2961.
19- Pfaller M.A., Jones R.N., Doern G.V., Sader H.S., Kugler K.C.: Surrey of blood stream infections attributable to gram positive cocci: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in United States, Canada, and Latin America from the SENTRY antimicrobial surveillance program. SENTRY participant group, Diag. Microbiol. Infect. Dis, 1999; 4:283-297.
20- Almer L.S., Shortridge V.D., Nilius A.: Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus. Diag. Microbiol. Infect. Dis, 2002, 43:225-232.

www.SID.ir