

Comparison of Two PCR Methods in determining the Methicillin-Resistant Gene in Coagulase-Negative Staphylococci

Bokaeian M.¹ *PhD*, Tahmasebi H.* *MSc*, Mohammadzadeh A.R.² *PhD*, Adabi J.¹ *MSc*, Sepehri Rad N.³ *MSc*

*Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

¹Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

²Microbiology Department, Medicine School, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

³Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Abstract

Aims: It is very important to detect the coagulase-negative Staphylococci, which produce the hospital infections. Being one of the most expensive and time-consuming stages before the polymerase chain reaction (PCR), DNA extraction is one of the primary stages of PCR. Then, it should be noticed that the elimination of the stage might save time and costs. The aim of this study was to compare two PCR methods including the method with the utilization of the extracted DNA with the extraction kit and the direct PCR method in the detection of the methicillin-resistant genes in the coagulase-negative Staphylococci.

Materials & Methods: In the descriptive cross-sectional study, 135 *Staphylococcus epidermidis* and 88 *Staphylococcus saprophyticus* samples were studied, separated from blood, wounds, urinary catheter, and urine samples of patients hospitalized in the treatment centers of Zahedan. The direct PCR was done on the *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* colonies. PCR with the extracted DNA was done for *mecA* and 16srDNA genes using the extraction kit, and the results were compared.

Findings: In both methods, *mecA* and 16srDNA genes were successfully amplified in 310bp and 420bp related to Staphylococcus bacteria identifying gene and methicillin resistant gene, respectively. In addition, there were approximately the same band qualities.

Conclusion: In order to save time and costs, the direct PCR method can be used to detect methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci.

Keywords

Staphylococcus epidermidis [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013212>];

Staphylococcus saprophyticus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68057790>];

Drug Resistance [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004351>];

Polymerase Chain Reaction [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016133>]

* Corresponding Author

Tel: +985433295744

Fax: +985433425732

Address: Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Dr. Hesabi Square, Zahedan, Iran. Postal Code: 98167-43463

h.tahmasebi87@yahoo.com

Received: November 22, 2015

Accepted: April 16, 2016

ePublished: June 30, 2016

مقایسه دو روش PCR در تعیین ژن مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی

محمد بکائیان PhD

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

حامد طهماسبی *MSc

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

علیرضا محمدزاده PhD

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

جواد ادبی MSc

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

ناهید سپهری راد MSc

مرکز تحقیقات بیماری عفونی - گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

چکیده

اهداف: شناسایی استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی که مسئول ایجاد عفونت‌های بیمارستانی هستند، بسیار اهمیت دارد. یکی از مراحل اولیه PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)، استخراج DNA است که از وقت‌گیرترین و هزینه‌برترین مراحل قبل از PCR است و با حذف آن می‌توان در زمان و هزینه صرفه‌جویی کرد. هدف از این مطالعه، مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج و PCR مستقیم در تعیین ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۱۳۵ نمونه استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ۸۸ نمونه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از نمونه‌های خون، زخم، سوند و کاتتر و ادرار بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان جداسازی شدند. PCR مستقیم از کلی‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس و PCR با DNA استخراج‌شده توسط کیت استخراج برای ژن‌های *mecA* و *16srDNA* انجام شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: در هر دو روش مورد استفاده ژن‌های *16srDNA* و *mecA* با طول باندهای ۴۲۰ و ۳۱۰ جفت‌باز که به ترتیب مربوط به ژن شناسایی باکتری استافیلوکوک و ژن مقاومت به متی‌سیلین بودند، با موفقیت تکثیر شدند و کیفیت باندهای مشاهده‌شده تقریباً برابر بود.

نتیجه‌گیری: برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌توان از PCR مستقیم در تشخیص استافیلوکوک کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوک کوآگولاز منفی، مقاومت دارویی، واکنش زنجیره پلی‌مراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۸

* نویسنده مسئول: h.tahmasebi87@yahoo.com

مقدمه

پاتوژن‌های بیمارستانی، یکی از عوامل مهمی هستند که می‌توانند باعث اختلال در روند بهبودی بیماران بستری در بیمارستان شوند [1]. یکی از پاتوژن‌های بیمارستانی که اخیراً جایگاه ویژه‌ای در این گروه پیدا کرده است، استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی هستند [2]. این باکتری‌ها دارای خصوصیات متنوعی هستند که از این دست می‌توان به تمایل ارگانیزم به اتصال و کلونیزه شدن در وسایل مصنوعی اشاره کرد [3]. این باکتری‌ها که بعضی از آنها به صورت فلور نرمال روی پوست انسان زندگی می‌کنند، در صورت فراهم شدن شرایط، قادر به ایجاد بیماری هستند [4]. استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی مسئول بروز عفونت‌های گسترده‌ای در انسان بوده و می‌توانند سبب انتشار عفونت‌های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند [5].

از جمله مهم‌ترین استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی که می‌توان به آنها اشاره کرد، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس هستند [6]. این باکتری‌ها که سال‌ها به‌عنوان ساپروفیت محسوب می‌شدند، در دهه‌های اخیر به دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، نظیر سوندها، کاتترها و پروتزها به عوامل مهاجم و بیماری‌زا مبدل شده‌اند [7]. همین امر باعث شده است که این باکتری‌ها جزء باکتری‌هایی که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند، محسوب شوند [8]. این باکتری‌ها علاوه بر ایجاد عفونت‌های خونی شدید، می‌توانند باعث بروز عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های پوستی، اندوکاردیت و پنومونی شوند [9]. از این رو، درمان نامناسب عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی و گاهی استفاده نابجا یا بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف باعث بروز مقاومت‌های گسترده‌ای در این گروه شده است که می‌توان به مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری‌ها اشاره کرد [10]. مکانیزم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها مربوط به تولید پروتئینی به نام *PBP2* (پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین) است که میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها دارد و سبب مقاومت به داروهای بتالاکتام می‌شود [11].

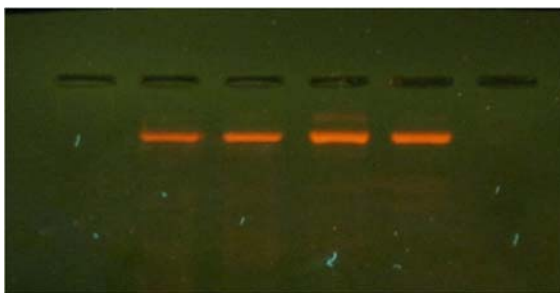
PBP4 و *PBP2A* انواع دیگری از *PBP*ها هستند که به دلیل اهمیت *PBP2* در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، این پروتئین بیشتر مورد بررسی قرار می‌گیرد [12]. تولید این پروتئین با ژن‌های *mec* موجود بر کروموزوم باکتری مرتبط است [13].

شناسایی این پاتوژن‌ها که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار اهمیت دارند، در بیشتر مواقع با روش‌هایی انجام می‌شود که دارای حساسیت و ویژگی مناسبی نیستند [14]. البته در تشخیص این

بیوشیمیایی مانند کاتالاز، کوآگولاز، بررسی تولید DNase، کشت روی محیط مانیتول‌سالت‌آگار و بررسی حساسیت به نوویوسین انجام گرفت. براساس CLSI (موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی)، با استفاده از دیسک‌های نوویوسین ۳۰ میکروگرم، باسیتراسین ۱۰ میکروگرم و پلی‌میکسین B ۱۰۰ واحدی سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس از استافیلوکوک ساپروفیتیکوس افتراق داده شدند. برای تشخیص استافیلوکوک هومینیس از استافیلوکوک اپیدرمیدیس نیز از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دی‌سفریوکسامین استفاده شد و نمونه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک فسفومایسین دارای قطر هاله بیشتر از ۳۰ میلی‌متر و برای دی‌سفریوکسامین دارای قطر هاله بیشتر از ۲۰ میلی‌متر بودند، استافیلوکوک اپیدرمیدیس در نظر گرفته شدند. پس از جداسازی گونه‌های باکتری، نمونه‌ها در دمای 20°C تا زمان جداسازی DNA نگهداری شدند. از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA و کیفیت‌سنجی آنها: به‌منظور استخراج DNA در ابتدا ایزوله‌های ذخیره‌شده در 20°C روی محیط بلاداگار کشت داده شده و در دمای 37°C به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت‌داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریارتانی‌براث تلقیح شد و به‌مدت ۲۰ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. سپس لوله‌ها از انکوباتور خارج شده و ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج PR881614 (سیناژن؛ ایران) و طبق روش کار شرکت سازنده انجام شد.

برای بررسی کیفیت DNAهای استخراج‌شده، ابتدا با رقت‌سازی DNAهای استخراج‌شده، OD (دانسیته نوری) آنها مورد خوانش قرار گرفت و همچنین ۵ میکرولیتر DNA روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (شکل ۱). DNAهای حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای 20°C ذخیره‌سازی شدند.



شکل ۱) کیفیت‌سنجی و تایید استخراج DNA باکتری‌های استافیلوکوک کوآگولازمنفی توسط کیت استخراج

باکتری‌ها و بعضاً سویه‌های مقاوم، آزمون‌های دقیقی هم وجود دارند که با هدف قراردادن ژن‌های پاتوژن یا عامل مقاومت، در کنار سرعت از دقت بالایی برخوردارند، اما به‌دلیل هزینه بالایی که دارند به‌صورت روتین قابل انجام نیستند [15]. PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های مولکولی است که می‌تواند برای ردیابی ژن‌های مختلف در مولکول DNA مورد استفاده قرار گیرد [16, 17]. PCR واکنشی است که توسط آن می‌توان به‌طور مصنوعی و در شرایط آزمایشگاهی ژن خاصی را در مولکول DNA تکثیر کرد [18]. سازوکار این واکنش به این صورت است که در ابتدا رشته‌های DNA الگو توسط حرارت در دمای 95°C از هم جدا می‌شوند و بعد از آن با اتصال قطعات خاصی به‌نام پرایمر در دمایی خاص، همانندسازی انجام می‌شود [19]. در PCR مراحل سه‌گانه به‌صورت دنا‌توراسیون، اتصال و طول‌سازی است که دما و مدت‌زمان هر مرحله و تعداد سیکل‌های تکرار شونده، با هم متفاوت است [5].

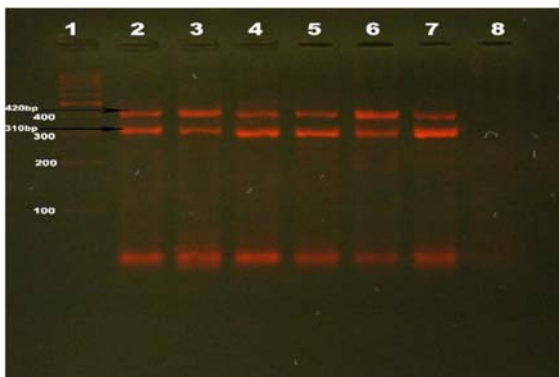
یکی مراحل PCR، آماده‌سازی و استخراج DNA است. این کار معمولاً با روش‌های جوشاندن، استفاده از فنل کلروفرم و کیت‌های استخراج انجام می‌شود و از طرفی PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده در برخی موارد علاوه بر تحمیل هزینه‌های مالی اضافه به محقق، سرعت کار را نیز کاهش می‌دهد [20]. با حذف مرحله استخراج DNA می‌توان سرعت انجام PCR را هنگام مطالعه روی تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها بالا برد [21]. در برخی باکتری‌ها از جمله استافیلوکوک‌ها می‌توان با استفاده از روش PCR مستقیم و برداشت از کلنی‌های باکتریایی، مرحله استخراج DNA را حذف کرد.

با توجه به اهمیت PCR برای تشخیص سریع و دقیق، هدف از این مطالعه مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج و PCR مستقیم در تعیین ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی بود.

مواد و روش‌ها

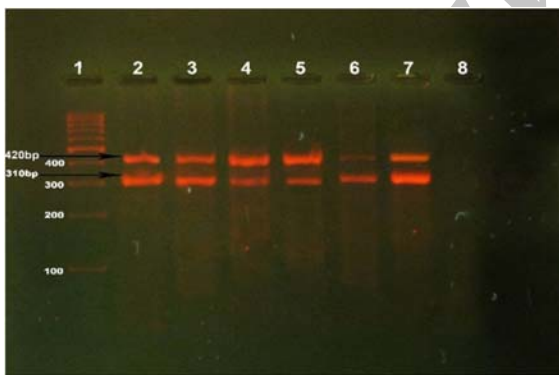
جداسازی نمونه‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی که طی سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، از مجموع ۸۳۹ نمونه گرفته‌شده، ۱۳۵ نمونه استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ۸۸ نمونه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از نمونه‌های خون، زخم، سوند و کاتتر و ادرار بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان جداسازی شدند. نمونه‌های به‌دست‌آمده توسط محیط BHI (مرک؛ آلمان) به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند. برای تعیین گونه‌های استافیلوکوک، نمونه‌ها روی محیط بلاداگار (مرک؛ آلمان) با ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و شناسایی گونه‌های استافیلوکوک کوآگولازمنفی با استفاده از روش‌های تشخیص میکروبی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های

شناسایی باکتری استافیلوکوک و ژن مقاومت به متی‌سپلین بودند، با موفقیت تکثیر شدند و کیفیت باندهای مشاهده‌شده تقریباً برابر بود (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR استافیلوکوک‌های کوآگولاژمنفی با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت (چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ تا ۷ نمونه‌های حاوی ژن 16sDNA با طول ۴۲۰bp و *mecA* با طول ۳۱۰bp، چاهک ۸ کنترل منفی)

از ۱۳۵ نمونه استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۱۱۹ مورد (۸۸/۱٪) با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت استخراج و ۱۱۷ مورد (۸۶/۶٪) با استفاده از PCR مستقیم دارای ژن *mecA* بودند، و از ۸۸ نمونه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ۷۱ مورد (۸۰/۶٪) با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده و ۶۸ مورد (۷۷/۲٪) با روش PCR مستقیم دارای ژن *mecA* بودند.



شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR مستقیم استافیلوکوک‌های کوآگولاژمنفی با استفاده از کلنی‌های مستقیم باکتری (چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ تا ۷ نمونه‌های حاوی ژن 16sDNA با طول ۴۲۰bp و *mecA* با طول ۳۱۰bp، چاهک ۸ کنترل منفی)

بحث

تشخیص باکتری‌های عامل بیماری و در کنار آن، مشخص کردن مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها، می‌تواند در امر درمان و کنترل مصرف دارو بسیار مهم باشد [22]. از این رو برای دست‌یافتن به یک تشخیص مطمئن و به‌صرفه، باید از روش‌های حساس استفاده کرد.

در روش PCR مستقیم، به‌جای استخراج DNA و انجام مراحل چندگانه آن، از کلنی تازه باکتری به‌صورت کشت‌های ۲۴ساعته استفاده شد. تازه‌بودن کلنی‌ها و عدم نگهداری آنها برای انجام PCR را باید مورد نظر قرار داد.

انجام PCR با DNA استخراج‌شده و PCR مستقیم: برای شناسایی ژن‌های *mecA* و 16srDNA از پرایمرهای این ژن‌ها استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱) پرایمرهای ژن‌های *mecA* و 16sDNA

اندازه (جفت‌باز)	طول توالی	پرایمرها
۴۲۰	CAGCTCGTGTCTGAGATGT AATCATTGTCCACCTTCG	16SrDNA-F 16SrDNAR
۳۱۰	CCTAGTAAAGCTCGGAA CTAGTCCATTGGTCCA	<i>mecA</i> -F <i>mecA</i> -R

به‌منظور انجام واکنش PCR، حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل؛ یک میکرولیتر از DNA الگو، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon؛ آلمان) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [14]. سپس واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad؛ ایالات متحده)، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷°C به مدت ۲ دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه انجام گرفت. برنامه PCR برای ژن 16srDNA مشابه ژن *mecA* انجام شد. محصولات PCR برای انجام الکتروفورز، در یخچال در دمای ۴°C+ نگهداری شدند.

برای انجام واکنش PCR مستقیم، به‌جای استفاده از DNA الگو و انجام مراحل مختلف استخراج، یک عدد از کلنی‌های باکتری تازه کشت‌داده‌شده با فیلدویلاتین برداشته و داخل میکس آماده‌شده تلقیح شد. برای بهتر شدن کلنی به مدت ۱۰ ثانیه میکس نهایی ورتکس شد. برای آماده‌سازی میکس نهایی حجم نهایی مطابق با روش اول به ۲۵ میکرولیتر رسانده و به‌جای یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر اضافه شد و با همان سیکل دمایی واکنش انجام گرفت.

برای الکتروفورز محصول PCR، ۸ میکرولیتر از آن در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و نتیجه نهایی توسط دستگاه مستندسازی ژل مدل CCD-Tab1 (کیازن؛ ایران) بررسی شد.

یافته‌ها

در هر دو روش مورد استفاده ژن‌های 16srDNA و *mecA* با طول باندهای ۴۲۰ و ۳۱۰ جفت‌باز که به ترتیب مربوط به ژن

انجام استخراج DNA و با استفاده از کلنی‌های تازه کشت داده و تلقیح آنها در میکس نهایی، به نتایج قابل قبولی دست یافت. در این زمینه مطالعات متعددی انجام شده است که نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر یکسان است. لیچتنتسگر و همکاران با مطالعه روی باکتری *پاستورولا موتی‌سیلا* با روش PCR مستقیم، نشان دادند که این روش برای شناسایی توکسین‌های این باکتری می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و در کنار داشتن ارزش تشخیصی مناسب، مشخص کردند که این روش در کنار روش‌هایی مانند الایزا و تزریق یک دوز کشنده توکسین به موش، دارای سرعت، دقت و ارزش قابل قبولی است [31]. *ناکائو* و همکاران هم طی یک مطالعه روی توکسین‌های دیفتری با استفاده از PCR مستقیم، مشخص کردند که این روش دارای حساسیت قابل قبولی برای تشخیص سم دیفتری است و می‌توان توسط آن نمونه‌های بالینی را از نظر حضور ژن *tox* مورد ارزیابی قرار داد [32]. *فود واگان* و همکاران طی یک مطالعه از روش PCR مستقیم برای ارزیابی باکتری *اشریشیا کلی* استفاده کردند که نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان‌دهنده تطابق این روش با روش مبتنی بر استخراج DNA بوده و باندهای به دست آمده در هر دو روش تقریباً یکسان و قابل استناد هستند [33]. *اینگلیس* و همکاران با استفاده از PCR مستقیم ردیابی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر را مورد بررسی قرار دادند [34]. *ون‌ها* و همکاران با مطالعه مولکولی روی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین، نشان دادند که روش PCR مستقیم می‌تواند یک روش مناسب در تشخیص این باکتری‌ها باشد، به طوری که حساسیت و ویژگی این روش در کنار کاهش قابل ملاحظه بار مالی، بیش از ۸۰٪ گزارش شد [35]. مطالعات مشابه انجام شده در ایران هم نشان‌دهنده این امر است که می‌توان با حذف مرحله استخراج و استفاده مستقیم از کلنی باکتری، با حفظ دقت، سرعت کار را بالا برد. در مطالعه *حسنی* و همکاران مشخص شد که می‌توان از روش PCR مستقیم برای مطالعه روی ژن‌های عامل توکسین در *کستریدیوم دیفیسیل* استفاده کرد. این مطالعه نشان داد که کیفیت باندهای به دست آمده در این روش با کیفیت باندهای به دست آمده در روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده کاملاً برابرند [28]. سایر مطالعات نشان می‌دهند که روش PCR مستقیم علاوه بر اینکه در مطالعات باکتریایی قابل استفاده است، در مطالعات غیرباکتریایی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشد، به طوری که مطالعه *نیشیمورا* و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص کرد که RT-PCR (PCR با نسخه‌برداری معکوس) مستقیم از اختصاصیت و حساسیت مناسبی برای شناسایی نوروویروس‌ها برخوردار است و حتی می‌تواند از این روش برای بررسی حضور نوروویروس در مدفوع نیز استفاده کرد [36]. علاوه بر پروکاریوت‌ها، PCR مستقیم در یوکاریوت‌ها هم مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه *فولادی* و همکاران، روش PCR مستقیم و سایر روش‌ها برای تشخیص لیشمانیوز جلدی مورد

یکی از بهترین و سریع‌ترین روش‌های ممکن برای این کار، شناسایی ژن‌های کدکننده این عوامل است که با حساسیت بسیار بالا و میزان خطای اندک، تشخیص را قابل اطمینان می‌کند [23]. PCR می‌تواند ژن‌های مد نظر را مورد بررسی قرار داده و اطلاعات دقیقی از نظر مولکولی در اختیار محقق قرار دهد [24]. این روش در کنار داشتن حساسیت و ویژگی بسیار بالا نسبت به روش‌های قدیمی در شناسایی خصوصیات میکروارگانیسم‌ها، از سرعت خوبی هم برخوردار است [24]. بالا بودن حساسیت این روش در تشخیص باکتری‌ها و عفونت‌های وابسته به باکتری‌های فرصت‌طلب مانند *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، که در برخی مواقع می‌توانند به واسطه وسایل پزشکی و آلودگی‌های سطوح بیماری‌های شدیدی را ایجاد کنند، نقش بسیار موثر و تعیین‌کننده‌ای دارد [25]. این در حالی است که با افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم استافیلوکوک کوآگولاز منفی، خصوصاً سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، برای تشخیص سریع و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم باید به روش‌های سریع و قابل اطمینان روی آورد [25].

با استفاده از روش‌های فنوتیپی و سرولوژیکی نمی‌توان عوامل ایجادکننده عفونت‌های وابسته به استافیلوکوک‌های مقاوم را به سرعت تشخیص داد و عامل پاتوژن را از بین برد [26]. با مشخص کردن ویژگی‌های ذاتی یا اکتسابی باکتری بیماری‌زا، از جمله داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید توکسین‌های خطرناک، می‌توان در کمترین زمان ممکن با تجویز مناسب‌ترین دارو در مناسب‌ترین دوز ممکن، علاوه بر درمان به موقع و کم کردن خطر ناشی از عفونت، از بروز مقاومت‌های گسترده به دلیل تشخیص غلط و تجویز اشتباه نیز جلوگیری کرد [27].

اگر چه PCR یک روش ساده، آسان و دردسترس برای تکثیر ژنوم است، اما به استخراج DNA که یک مرحله وقت‌گیر است، نیاز دارد. برای رسیدن به بهترین نتایج در فرآیند PCR باید کیفیت DNA استخراجی را مد نظر قرار داد تا بهترین تکثیر را از قطعه مورد نظر داشته باشیم [28]. از این رو برای استخراج DNA روش‌های متفاوتی از جمله جوشاندن، فنل کلروفرم، رسوب با اتانول، استفاده از شوینده‌ها و استفاده از کیت‌های استخراج وجود دارد [29]. هر یک از این روش‌ها در کنار وقت‌گیر بودن و تحمیل هزینه جانبی، دارای مشکلات و معایب زیادی نیز هستند [20]. روش فنل کلروفرم علاوه بر کُند بودن آن، به دلیل سمی و خطرناک بودن این ماده یک روش غیرایمن است و کارکردن با آن در طولانی مدت باعث بروز مشکلاتی می‌شود [30]. روش رسوب با اتانول هم می‌تواند با انتقال اتانول در مراحل نهایی باعث بروز خطا و حتی از بین رفتن محصول نهایی شود که در نهایت کار را با خطا مواجه می‌کند [28]. روش جوشاندن نیز با داشتن شاخصه وقت‌گیر بودن، کیفیت نسبتاً پایینی را از DNA استخراج شده عرضه می‌کند [25].

اما در کنار این موارد، برای تکثیر ژن‌های باکتریایی می‌توان بدون

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و از محل اعتبارات طرح‌های تحقیقاتی صورت گرفت.

منابع

- 1- Inweregbu K, Dave J, Pittard A, Nosocomial infections. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2005;5(1):14-7.
- 2- Martin MA, Pfaller MA, Wenzel RP. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: Mortality and hospital stay. *Ann Intern Med*. 1989;110(1):9-16.
- 3- Cheung GY, Otto M. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(3):208-16.
- 4- Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med*. 1987;316(5):927-31.
- 5- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*. 1994;19(2):231-43.
- 6- Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: Role as pathogens. *Ann Rev Med*. 1999;50(1):223-36.
- 7- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*. 1994;19(2):231-43.
- 8- Makki AR, Sharma S, Duggirala A, Prashanth K, Garg P, Das T. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative staphylococci (CoNS) other than *Staphylococcus epidermidis* isolated from ocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(12):9018-22.
- 9- Raei F, Eftekhari F. Studying the presence of blaZ gene and betalactamase production in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Iran J Med Microbiol*. 2008;2(2):35-41.
- 10- Maskell R. Importance of coagulase-negative staphylococci as pathogens in the urinary tract. *Lancet*. 1974;1(7867):1155-8.
- 11- Uçkay I, Harbarth S, Ferry T, Lübbecke A, Emonet S, Hoffmeyer P, et al. Meticillin resistance in orthopaedic coagulase-negative staphylococcal infections. *J Hosp Infect*. 2011;79(3):248-53.
- 12- Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(9):817-22.
- 13- Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol*. 2007;56(10):1328-33.
- 14- Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol*. 2011;147(2):142-8.
- 15- Zadoks RN, Watts JL. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol*. 2009;134(1-2):20-8.

با توجه به مقطعی بودن این مطالعه و عدم وجود زمان کافی برای انجام آزمایشات تکمیلی، به نظر می‌رسد که با انجام مطالعات جامع‌تر می‌توان انجام PCR مستقیم را بهتر و بیشتر مورد آزمایش قرار داد. با از بین بردن نتایج کاذب (مثبت و منفی) علاوه بر اینکه می‌توان این تست را به صورت پیش‌فرض و تایید شده در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار داد، نتایج نیز در مقایسه با PCR معمولی قابل استناد خواهند بود. همچنین عدم انجام این آزمایش روی سایر گونه‌های باکتریایی یکی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده به این امر پرداخته شود.

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت با توجه به وقت‌گیر بودن مراحل استخراج DNA و پرهزینه بودن برخی کیت‌های استخراج DNA، استفاده از روش PCR مستقیم می‌تواند بسیار مفید باشد. علاوه بر این، در برخی روش‌های استخراج ممکن است برجای ماندن برخی مواد مورد استفاده در فرآیند استخراج، تاثیر بدی بر کیفیت و پایداری DNA بگذارد و نتایج بررسی را با خطا یا حتی با شکست مواجه کند. البته به دلیل عدم در دسترس بودن منابع کافی و نتایج مورد بررسی برای سایر باکتری‌ها از خانواده‌های مختلف خصوصاً باکتری‌های گرم منفی، نمی‌توان در گام اول این روش را برای استفاده گسترده پیشنهاد داد و توصیه می‌شود که این روش روی سایر باکتری‌ها از جنس‌های مختلف نیز انجام شود. اما با توجه به نتایج قابل قبولی که این روش نسبت به روش PCR و DNA استخراج شده داشت، توصیه می‌شود که در مواردی که قطعیت آنها اثبات شده است، از کلنی مستقیم برای انجام آزمایشات PCR استفاده شود.

نتیجه گیری

برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌توان از PCR مستقیم در تشخیص استافیلوکوک کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولان مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی - گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و همچنین همکاران محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی زاهدان که در به‌ثمر رسیدن این پژوهش یاریگر بودند، تشکر نمایند.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش در سال ۱۳۹۳ به تصویب کمیته اخلاق و پژوهش‌های علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان رسید.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان این پژوهش گزارش نشده است.

- 28- Ahsani MR, Shamsaddini BM. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in *Clostridium Perfringens* typing. *Iran Vet J.* 2012;8(4):5-12.
- 29- Mousazade Moghadam M, Babavalian H, Mirnejad R, Shakeri F. Rapid DNA extraction of bacterial genome of *Staphylococcus aureus* using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using PCR. *Med Lab J.* 2012;6(1):35-42.
- 30- Eickbush TH, Moudrianakis EN. The histone core complex: An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochem.* 1978;17(23):4955-64.
- 31- Lichtensteiger CA, Steenberg SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol.* 1996;34(12):3035-9.
- 32- Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1651-5.
- 33- Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37:239-43.
- 34- Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(6):3435-47.
- 35- van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and chromagar MRSA) for use with infection-control swabs. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2486-90.
- 36- Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Tonoike H, Shirasaka Y, et al. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J Virol Methods.* 2010;163(2):282-6.
- 37- Fazaeli A, Fuladi B, Hashemi Shahri M, Sharifi I. Evaluation of a direct PCR in comparison with routine microscopy and in vitro culture for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Public Health.* 2007;36(Suppl 1):1-2.
- 16- Andreson R, Reppo E, Kaplinski L, Remm M. Genomemasker package for designing unique genomic PCR primers. *Bio Med Clin Bioinform.* 2006;7:172.
- 17- Walley AJ. PCR protocols: current methods and applications. *J Med Genet.* 1994;31(1):87.
- 18- Ottens R, Templeton J, Paradiso V, Taylor D, Abarno D, Linacre A. Application of direct PCR in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2013;4(1):e47-8.
- 19- Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 1993;15:31-40.
- 20- Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. *Zanko J Med Sci.* 2014;15(45):9-16.
- 21- Chum PY, Haines JD, André CP, Kuusisto PK, Kelley ML. Genotyping of plant and animal samples without prior DNA purification. *J Vis Exp.* 2012;10(67):3791-3844.
- 22- Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4740-4.
- 23- Capoluongo E, Giglio A A, Lavieri MM, Lesnoni-La Parola I, Ferraro C, Cristaudò A, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. *J Dermatol Sci.* 2001;26(2):145-55.
- 24- Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* 2000;15(2):115-22.
- 25- Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: A review. *Acta Oncol.* 1991;30(1):87-105.
- 26- Montazeri EA, Khosravi AD, Jolodar A, Ghaderpanah M, Azarpira S. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. *Burns.* 2015;41(3):590-4.
- 27- Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(9):510.