مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۲/هفته دوم خرداد ماه ۱۳۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۲۵

مقایسه‌ی روش‌های اگزاسیلین آگار دایلوشن و دیسک دیفیوژن سفوکسیتین با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) در تعیین مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس ارئوس

دکتر سید اصغر هوایی[۱]، دکتر شراره مقیم[۲]، مجتبی شاهین[۳]، دکتر امیر عظیمیان[۴]، فهیمه قنبری[۵]، داریوش شکری[۶]، مجتبی اکبری[۷]، نفیسه‌سادات حسینی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس ارئوس یکی از باکتری‌های مهم بیماری‌زا و بسیار قوی در ایجاد بیماری‌های اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های اکتسابی از جامعه می‌باشد. این باکتری، باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها از عفونت‌های پوستی سطحی گرفته تا عفونت‌های بسیار شدید و مهاجم شامل سپتی‌سمی، پنومونی، اندوکاردیت و آبسه‌های عمیق پوست می‌شود. همچنین، یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که مرگ و میر آن می‌تواند تا ۳۵ درصد افزایش یابد. بنابراین، برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی باید درصد شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) را به سرعت شناسایی کرد و اقدامات درمانی را برای کنترل این عفونت‌ها انجام داد.

روش‌ها: ۱۵۰ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس ارئوس از نمونه‌های مختلف بالینی از بیمارستان‌های الزهرا (س) و شریعتی اصفهان جدا شد. برای شناسایی ژن mecA، برای تمام نمونه‌های موجود PCR (Polymerase chain reaction) انجام گرفت. سپس حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) به روش آگار دایلوشن برای اگزاسیلین محاسبه شد؛ قوانین CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را MIC این روش می‌دانند. برای انجام تست آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های واجد mecA، دیسک سفوکسیتین به روش دیسک دیفیوژن بر روی ایزوله‌های دارای ژن mecA انجام گرفت و نتایج این سه روش با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها: از ۱۵۰ ایزوله‌ی جدا شده، ۶۲ نمونه (۴۱/۳۳ درصد) به روش PCR دارای ژن mecA بودند؛ ولی در روش آگار دایلوشن برای اگزاسیلین، ۵۶ نمونه از ۶۲ مورد (۹۰/۳۳ درصد) دارای ژن mecA تشخیص داده شد. در روش دیسک دیفیوژن برای دیسک سفوکسیتین نیز ۵۳ نمونه از ۶۲ مورد (۸۵/۴۸ درصد) دارای ژن mecA تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: روش آگار دایلوشن برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین از حساسیت بیشتری نسبت به روش دیسک دیفیوژن برخوردار است. با این وجود، روش PCR بهترین روش برای شناسایی سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین می‌باشد؛ چرا که بعضی از سویه‌ها در آزمایش‌های فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین به دلیل عدم بیان ژن mecA حساس می‌باشد، که توسط PCR مورد شناسایی قرار می‌گیرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس ارئوس، mecA، متی‌سیلین، مقاوم

ارجاع: هوایی سید اصغر، مقیم شراره، شاهین مجتبی، عظیمیان امیر، قنبری فهیمه، شکری داریوش، اکبری مجتبی، حسینی نفیسه‌سادات. **مقایسه‌ی روش‌های اگزاسیلین آگار دایلوشن و دیسک دیفیوژن سفوکسیتین با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction) در تعیین مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس ارئوس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۲): ۴۷۴-۴۶۶

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۶- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۷- اپیدمیولوژیست، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید اصغر هوایی
Email: havaei@med.mui.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس ارئوس از باکتری‌های کوکسی شکل Gram مثبت می‌باشد و اغلب بر روی پوست و غشاهای مخاطی حضور دارد؛ این باکتری، یک عامل بیماری‌زای بسیار قوی در ایجاد بیماری‌های اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های اکتسابی از جامعه محسوب می‌شود (۲-۱). نشان داده شده است که میزان مرگ و هزینه‌های پزشکی استافیلوکوکوس ارئوس دو برابر دیگر عفونت‌های بیمارستانی است (۳).

تاریخچه‌ی مقاومت استافیلوکوکوس ارئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به سال ۱۹۴۱ بر می‌گردد؛ هنگامی که پنی‌سیلین برای درمان عفونت‌ها به کار رفت. حدود ۲ سال بعد از تجویز این دارو، اولین سوش‌های مقاوم به پنی‌سیلین گزارش شد که به دلیل تولید نوعی پنی‌سیلیناز بود. برای حل این مشکل، محققان آنتی‌بیوتیکی نیمه‌صناعی به نام متی‌سیلین را که نسبت به پنی‌سیلیناز مقاوم بود، عرضه کردند ولی یک سال بعد، یعنی در سال ۱۹۶۱، مقاومت باکتری به این دارو از انگلستان گزارش شد. متعاقب جداسازی اولیه‌ی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant staphylococcus aureus)، اپیدمی‌های زیادی به وسیله‌ی این سویه‌ها به وقوع پیوسته است و اکنون در کشورهای زیادی در دنیا این سویه‌های مقاوم به صورت اندومیک وجود دارد (۲). در این سویه‌ها، یک پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین تغییر یافته‌ای به نام PBP2a وجود دارد که توسط ژن mecA کد می‌شود و قرابت (Affinity) پایینی برای آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام دارد (۴).

بعد از ظهور سویه‌های MRSA، به سرعت انواع چند مقاومتی گسترش یافت؛ به طوری که درصد عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها از ۲ درصد در سال ۱۹۷۵ به ۳۴ درصد در سال ۱۹۹۲ و به ۶۴ درصد در سال ۲۰۰۳ افزایش یافت. عفونت‌های پوستی، که در حدود ۱۱/۶ میلیون تخمین زده شده، اغلب توسط استافیلوکوکوس ارئوس ایجاد می‌شود و درصد عفونت‌های پوستی ایجاد شده توسط MRSA از ۲۹ درصد در سال ۲۰۰۱ به ۶۴ درصد در سال ۲۰۰۴ افزایش یافته است (۶-۵).

در این تحقیق، فراوانی سویه‌های MRSA با سه روش دیسک دیفیوژن، تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) به روش آگار دایلوشن و PCR (Polymerase chain reaction) برای ژن mecA در باکتری‌های استافیلوکوکوس اروئوس جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی بررسی شد.

روش‌ها

نمونه‌ها

۱۵۰ نمونه‌ی استافیلوکوکوس ارئوس از بیمارستان‌های الزهرا (س) و شریعتی شهر اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌های پوستی ۳۰/۷ درصد (۴۶ نمونه)، خونی ۲۲ درصد (۳۳ نمونه)، ریوی ۲۱/۳ درصد (۳۲ نمونه)، ادراری ۶/۶ درصد (۱۰ نمونه)، بافت ۴/۶ درصد (۷ نمونه)، سینوویال ۲ درصد (۳ نمونه) و سایر قسمت‌ها ۱۲/۶ درصد (۱۹ نمونه) را شامل می‌شدند که پس از جمع‌آوری، توسط محیط Blood agar به آزمایشگاه منتقل شدند و تشخیص قطعی آن توسط آزمایش‌های مختلف مورد تأیید قرار گرفت.

این باکتری کوکسی Gram مثبت، کاتالاز مثبت و

DNAase مثبت می‌باشد؛ تولید کواگولاز توسط پلاسمای سیتراته خرگوش به روش لوله نیز تأیید شد. پس از رشد ۲۴ ساعته در محیط Mannitol salt agar (MSA)، تشخیص نهایی صورت گرفت. برای نگه‌داری نمونه‌ها، از محیط مایع Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول به عنوان نگه‌دارنده استفاده شد و سپس نمونه‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تعیین حساسیت نسبت به متی‌سیلین به روش آگار اسکرین

برای حصول اطمینان از حساسیت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین، تعیین حساسیت به روش آگار اسکرین نیز انجام شد. در این روش نیز، همانند دیسک دیفیوژن، از کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته استفاده گردید. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)، ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به عنوان مقاومت به متی‌سیلین در روش آگار دایلوشن می‌داند. بدین ترتیب که پس از تهیه‌ی پودر اگزاسیلین شرکت Sigma (استرالیا)، این دارو بر طبق فرمول زیر به میزان مشخص به محیط Müller-Hinton agar اضافه گردید. محیط Müller-Hinton مورد استفاده در این روش، دارای ۴ درصد NaCl و همچنین ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر پودر اگزاسیلین بود (۸-۷).

$$\text{وزن (mg)} = \frac{\text{حجم (ml)} \times \text{غلظت } (\frac{\mu g}{ml})}{\text{قدرت دارو } (\mu g/mg)}$$

تعیین MIC برای متی‌سیلین

پس از تعیین ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین توسط روش آگار اسکرین، روش آگار دایلوشن برای انجام MIC استفاده شد و محیط Müller-Hinton agar دارای ۴ درصد NaCl حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین (Sigma) تهیه گردید. از کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته در محیط Blood agar، سوسپانسیون معادل نیم McFarland تهیه شد و در هر قطره، با غلظت نهایی 10^4 در محیط Müller-Hinton که غلظت‌های متفاوت اگزاسیلین در آن موجود بود، کشت داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و شاهد مثبت و منفی همانند آگار اسکرین مورد استفاده قرار گرفت (۱۰-۹).

روش دیسک دیفیوژن

از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری، سوسپانسیون معادل نیم McFarland تهیه و در محیط Müller-Hinton agar به روش کشت جارویی تلقیح شد؛ سپس، از دیسک سفوکسیتین ساخت شرکت HiMedia (آمریکا) پس از تست روی سویه‌ی استاندارد ۲۵۹۲۳ استفاده شد. آن گاه، در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و سپس، نتایج بر اساس پروتکل شرکت سازنده‌ی آن خوانده شد (۱۱).

استخراج DNA باکتری

برای استخراج DNA باکتری، ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری در محیط TSB در داخل میکروتیوب اضافه و به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از اضافه کردن بافر TE (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid, widely abbreviated) و لیزوزیم و نگهداری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، بافر لیز کننده نیز به آن اضافه و در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت نگهداری شد. سپس،

با استفاده از کیت K0512 شرکت Fermentas (آمریکا) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده‌ی آن، DNA استخراج گردید (۱۲).

PCR برای شناسایی ژن mecA

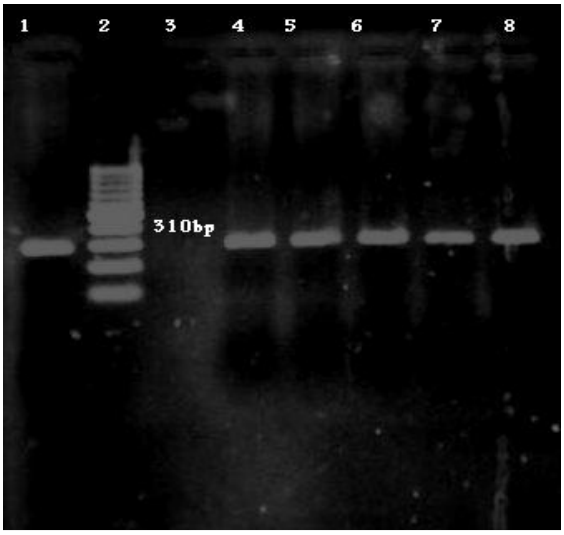
برای انجام مراحل PCR برای ژن mecA، از ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۴ میکرولیتر DNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate)، ۰/۶ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F (با توالی '5 TGGCTATCGTGTCACAATCG 3') و R (با توالی '5 CTGGAACTTGTTGAGCAGAG 3')، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز، به همراه ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه استفاده شد که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

به منظور شناسایی ژن mecA به روش PCR، برنامه‌ی دمایی شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۰ سیکل شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه دنبال شد. مدت زمان طویل شدن نهایی نیز ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. از ژل آگاروز ۱ درصد برای مشخص کردن ژن mecA با وزن مولکولی ۳۱۰ bp استفاده گردید (۱۳).

یافته‌ها

نتایج PCR برای ژن mecA

از بین ۱۵۰ نمونه‌ی ایزوله شده که از نظر حضور ژن mecA مورد بررسی قرار گرفت، تعداد ۶۲ نمونه (۴۱/۳۳ درصد) دارای ژن mecA بودند. طبق پرایمرهای مورد استفاده، ژن mecA دارای وزن مولکولی ۳۱۰ bp بود که در شکل شماره‌ی ۱ با استفاده از مارکر ۱۰۰ bp نمایش داده شده است.



شکل ۱. نمای Polymerase chain reaction (PCR) انجام گرفته برای بررسی وجود ژن mecA
ستون ۱ شاهد مثبت سوش استافیلوکوکوس ارئوس (ATCC:33591)، ستون ۲ مارکر ۱۰۰ bp، ستون ۳ شاهد منفی (آب مقطر) و ستون‌های ۴ تا ۸ نمونه‌های مثبت از نظر وجود ژن mecA

نتایج آگار اسکرین

در این روش، ۵۶ نمونه از ۶۲ نمونه (۹۰/۳۳ درصد) مقاوم تشخیص داده شدند؛ یعنی این روش دارای حساسیتی حدود ۹۰/۳۳ درصد بود.

نتایج MIC توسط روش آگار دایلوشن

پس از آن که نمونه‌های مقاوم (۵۶ نمونه) توسط آگار اسکرین شناسایی شدند، میزان MIC این نمونه توسط روش روش آگار دایلوشن بررسی شد. طبق دستورالعمل CLSI، پایین‌ترین میزان MIC برای نمونه‌های دارای ژن mecA نسبت به آگزاسیلین بیشتر از ۴ میکروگرم و بالاترین میزان MIC نیز بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم در نظر گرفته شود. نتایج در جدول شماره‌ی ۱ قابل ملاحظه است.

نتایج روش دیسک دیفیوژن برای دیسک سفوکسیتین

در این روش، که به عنوان روش معمول تشخیص استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده می‌شود، ۵۳ نمونه از ۶۲ نمونه (۸۵/۴۸ درصد) مقاوم تشخیص داده شدند؛ یعنی این روش دارای حساسیتی حدود ۸۵/۴۸ درصد بود.

جدول ۱. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) به دست آمده از ۵۶ نمونه‌ی مقاوم به متی‌سیلین

حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد (درصد) نمونه‌ها
۸	۳ (۵/۳۵)
۱۶	۵ (۸/۹۳)
۳۲	۷ (۱۲/۵۰)
۶۴	۶ (۱۰/۷۱)
۱۲۸	۱۳ (۲۳/۲۱)
۲۵۶	۲۲ (۳۹/۲۸)

MIC: Minimum inhibitory concentration

بحث

استافیلوکوکوس ارئوس یک عامل بیماری‌زای بسیار قوی در ایجاد بیماری‌های اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های اکتسابی از جامعه می‌باشد. این باکتری باعث طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های پوستی سطحی گرفته تا عفونت‌های بسیار شدید و مهاجم شامل سپتی‌سمی، پنومونی، اندوکاردیت و آبسه‌های عمیق پوست، می‌شود. همچنین، مرگ و میر ناشی از آن می‌تواند تا ۳۵ درصد افزایش یابد (۱۵-۱۴).

بیماری‌زایی استافیلوکوکوس ارئوس به عوامل مختلفی بستگی دارد که باعث اتصال باکتری به سطوح، فرار از سیستم ایمنی و نیز ایجاد اثرات سمی در میزبان می‌شود. این فاکتورها شامل اجزای سطح سلول (مثل پروتئین A و پروتئین‌های متصل شونده به کلاژن) و اگزوپروتئین‌های گوناگون است (۱۵-۱۴).

به علت شیوع سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از یک سو و پیدایش سویه‌های مقاوم به وانکومایسین (به عنوان آخرین داروی انتخابی) از سوی دیگر، کنترل استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان یک مشکل رو به افزایش جهانی مطرح می‌باشد (۲).

تحقیقات در آمریکا، کانادا و اروپا نشان می‌دهد که استافیلوکوکوس ارئوس ۲۲ درصد عفونت‌های خونی، ۲۳/۲ درصد عفونت‌های تنفسی تحتانی و ۳۹/۲ درصد عفونت‌های پوستی را باعث می‌شود (۱). در تحقیق حاضر، میزان شیوع نمونه‌های پوستی ۳۰/۷ درصد (۴۶ نمونه)، خونی ۲۲ درصد (۳۳ نمونه)، ریوی ۲۱/۳ درصد (۳۲ نمونه)، ادراری ۶/۶ درصد (۱۰ نمونه)، بافت ۴/۶ درصد (۷ نمونه)، سینوویال ۲ درصد (۳ نمونه) و سایر قسمت‌ها ۱۲/۶ درصد (۱۹ نمونه) بود.

Cekovska و همکاران مطالعه‌ای بر روی ۲۱۰ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس ارئوس انجام دادند؛ آنان حساسیت به متی‌سیلین را با روش‌های فنوتیپی و PCR تعیین و سه سویه‌ی فاقد ژن mecA را با روش فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین گزارش نمودند (۱۶).

در مطالعه‌ای که در استرالیا بر روی ۲۰۶ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس ارئوس انجام گرفت، ۶۸ درصد از ایزوله‌ها به طور فنوتیپی حساسیت به اگزاسیلین را به نشان دادند؛ در این میان، ۱ ایزوله با فنوتیپ حساس، دارای ژن mecA بود و از ۳۲ درصد باقی‌مانده، که به طور فنوتیپی مقاوم بودند، ۴ مورد فاقد ژن mecA گزارش شد (۱۷).

در مطالعه‌ی Sakoulas و همکاران روی ۲۰۳

سویه‌ی استافیلوکوکی، حساسیت به متی‌سیلین با روش‌های فنوتیپی (دیسک دیفیوژن) و ژنوتیپی (PCR) بررسی شد. در این مطالعه، دو سویه‌ی دارای ژن mecA در روش فنوتیپی نسبت به متی‌سیلین حساس گزارش گردید (۱۸).

در بررسی Petinaki و همکاران در یونان، ۲۵۰ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس ارئوس از نظر مقاومت به متی‌سیلین با روش‌های دیسک دیفیوژن و PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۷ ایزوله (۱۴/۸ درصد) از نظر mecA مثبت و ۲۱۳ ایزوله (۸۵/۲ درصد) منفی بود. از بین ۲۱۳ ایزوله‌ی mecA منفی در روش دیسک دیفیوژن، ۲۰۰ مورد حساس به متی‌سیلین، ۳ مورد به طور کاذب مقاوم به متی‌سیلین و ۱۰ مورد هم دارای مقاومت متوسط به متی‌سیلین مشخص شد. از ۳۷ ایزوله‌ی mecA مثبت، ۳۰ ایزوله (۸۲ درصد) در روش دیسک دیفیوژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند و ۷ ایزوله (۱۸ درصد) به طور منفی کاذب حساس به متی‌سیلین بودند (۱۹).

در تحقیق حاضر نیز از ۶۲ ایزوله‌ی mecA مثبت، ۵۳ ایزوله (۸۵/۴۸ درصد) در روش دیسک دیفیوژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند و ۹ ایزوله (۱۴/۵۲ درصد) نیز به طور منفی کاذب حساس به متی‌سیلین بودند که با مطالعه‌ی Petinaki و همکاران (۱۹) مشابه می‌باشد.

در تحقیقی که توسط نادری نسب و همکاران انجام شد، ۸۶ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس ارئوس از نظر مقاومت به متی‌سیلین به دو روش PCR و دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد، ۴۶ ایزوله در هر دو روش به متی‌سیلین مقاومت داشتند. از ۴۰ ایزوله‌ای که از نظر ژن mecA منفی بودند، ۱۱ مورد (۱۲/۸ درصد) حساسیت، ۲۶ مورد (۳۰/۲ درصد) مقاومت و ۳ مورد (۳/۵ درصد) نیز مقاومت سطح پایین را در روش دیسک دیفیوژن نشان دادند (۱۱).

با توجه به موارد یاد شده در مورد مقاومت‌های کاذب نسبت به متی‌سیلین و نتایج به دست آمده از آن، در مطالعه‌ی حاضر برای جلوگیری از به دست آمدن نتایج مثبت کاذب، از روش آگار اسکرین برای مشخص کردن قطعی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده شد. اغلب سویه‌های دارای ژن mecA در روش آگار اسکرین نسبت به آگزاسیلین مقاوم (۹۰/۳۳ درصد) و سویه‌های فاقد ژن mecA در روش آگار اسکرین حساس به اگزاسیلین بودند.

بر طبق دستورالعمل CLSI، روش آگار اسکرین به عنوان بهترین روش فنوتیپی برای تشخیص استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین شناخته شده است. در بررسی Perez و همکاران در کشور برزیل بر روی ۶۹ نمونه برای تشخیص فنوتیپی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین، حساسیتی حدود ۹۸ درصد برای این روش گزارش شد (۱۰). در تحقیق حاضر حساسیت این روش حدود ۹۰ درصد بود.

در سال ۲۰۰۴، میزان مقاومت به متی‌سیلین در اروپا ۲۰ درصد (۲۰) و در آمریکا بین ۲۳ تا ۵۵ درصد گزارش شده است (۲۱). در کشور ترکیه نیز در سال ۲۰۰۸، این میزان ۵۱ درصد گزارش گردیده است (۲۲). در ایران، فراوانی سویه‌های MRSA در تحقیق رهبر و همکاران ۵۳ درصد (۲۳) و در گزارش فتح‌الله زاده و همکاران ۳۶ درصد (۲۴) و در بیمارستان نمازی شیراز ۴۳ درصد (۲۵) بوده است. در تحقیق هوایی و همکاران در سال ۱۳۸۸ در

بیمارستان الزهرای (س) اصفهان نیز این میزان ۳۱ درصد گزارش شده است (۲۶). در تحقیق حاضر میزان مقاومت به متی‌سیلین ۴۱ درصد بود.

در مطالعات Perez و همکاران (۱۰) و همچنین، Skov و همکاران (۲۷) بر روی MIC استافیلوکوکوس ارئوس، MIC بیشتر از ۴ µg/ml مقاوم به متی‌سیلین و مقادیر کمتر از آن، حساس به متی‌سیلین بودند. در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه موارد فوق بود.

نتیجه‌گیری

در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن، استفاده از روش‌های دیگر مثل PCR و آگار اسکرین از حساسیت بیشتری برای تعیین ایزوله‌های MRSA برخوردار است؛ ولی عیب عمده‌ی روش آگار اسکرین وقت‌گیر بودن و هزینه‌ی بالای آن نسبت به روش دیسک دیفیوژن است.

روش PCR به عنوان روش استاندارد برای ردیابی ژن‌های باکتری استفاده می‌شود.

نکته‌ی مهم آن است که پس از شناسایی استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین، باید اقدامات لازم جهت درمان مناسب و کنترل آن انجام شود. با انجام این گونه تحقیقات می‌توان شناخت بهتری نسبت به شیوع استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین در جامعه و در نتیجه، کنترل بیشتر بر روی آن داشته باشیم تا از مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های غیر ضروری جلوگیری کنیم.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از استادان محترم گروه میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against S. aureus infection: from the lab bench to phase III clinical trials. Vaccine 2004; 22(7): 880-7.
2. Wielders CL, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. mecA gene is widely disseminated in Staphylococcus aureus population. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 3970-5.
3. Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, et al. Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. N Engl J Med 2002; 346(7): 491-6.
4. Baddour MM, AbuElKheir MM, Fatani AJ. Comparison of mecA polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol 2007; 55(6): 473-9.
5. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin Infect Dis 2006; 42(3): 389-91.
6. Moran GJ, Amii RN, Abrahamian FM, Talan DA. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in community-acquired skin infections. Emerg Infect Dis 2005; 11(6): 928-30.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton agar- approved standard. 1st ed [Online]. 1996. Available from: URL: http://www.iso90.ir/phocadownload/csli/M06-A.pdf.
8. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3781-4.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-approved standard. 8th ed [Online]. 2008. Available from:

URL:http://www.iso90.ir/phocadownload/csli/M7-A7.pdf.
10. Perez LR, Dias C, d'Azevedo PA. Agar dilution and agar screen with cefoxitin and oxacillin: what is known and what is unknown in detection of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 8): 954-6.
11. Naderi Nasab M, Tavakol Afshari J, Nazem M, Fateh Manesh P, Faramarzi H, Khodadust MA. Methicillin-resistant staphylococcus aureus determined by phenotypic methods. Med J Mashad Univ Med Sc 2005; 48(1): 7-16. [In Persian].
12. Kumar R, Yadav BR, Dev K, Singh RS. A simple protocol for DNA extraction from staphylococcus aureus [Online] 2008. Available from: URL: http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNAExtraction- from-Staphylococcus-Aureus-4999.html.
13. Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, Gigi J, Vandercam B, Reynaert M, et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. J Clin Microbiol 1998; 36(8): 2366-8.
14. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. Staphylococcus aureus isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2384-90.
15. Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, et al. Identification of the capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus clinical isolates by PCR and agglutination tests. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 725-9.
16. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison of susceptibility test methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. Bratisl Lek Listy 2005; 106(4-5): 163-7.
17. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother 2002; 49(5): 793-801.
18. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3946-51.
19. Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatzi F, Kontos F, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the hospitals of central Greece. Int J Antimicrob Agents 2001; 18(1): 61-5.
20. Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3077-82.
21. Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 2): 3-10.
22. Adaleti R, Nakipoglu Y, Karahan ZC, Tasdemir C, Kaya F. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Infect Dev Ctries 2008; 2(1): 46-50.
23. Rahbar M, Yaghoobi M, Fattahi A. Comparison of different laboratory methods for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Pak J Med Sci 2006; 22(4): 442-5.
24. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008; 14(3): 217-20.
25. Japoni A, Alborzi A, Rasoli M, Farshad S. Distribiotion patterns of methicillin resistance genes (mecA) in staphylococcus aureus isolated from clinical from specimens. Iran Biomed J 2004; 8(4): 173-8.
26. Havaei SA, Karbalaeizadeh Babaki M, Pishva E. Comparison of the results of polymerase chain reaction and oxacillin agar dilution methods in determining resistance to methicillin in isolated staphyloccus aureus at Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. J Isfahan Med sch 2011; 29(151): 1175-82. [In Persian].
27. Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A, Karlsson A, Mills K, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar. J Clin Microbiol 2006; 44(12): 4395-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 08.02.2013
Vol. 31, No. 232, 2nd Week, June 2013
Accepted: 14.04.2013

A Comparison between Polymerase Chain Reaction, Oxacillin Agar Dilusion and Cefoxitin Disk Diffusion Methods in Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus

Seyed Asghar Havaei PhD[1], Sharareh Moghim PhD[2], Mojtaba Shahin[3], Amir Azimian PhD[4], Fahimeh Ghanbari MSc[5], Dariush Shokri MSc[6], Mojtaba Akbari MSc[7], Nafiseh Sadat Hoseini[3]

Original Article

Abstract

Background: Staphylococcus aureus (S. aureus) is an important human pathogen associated with hospital- and community-acquired diseases, a wide range of infectious disease including minor skin disease to more sever and aggressive infections such as septicemia, pneumonia, endocarditis, and deep skin abscess. S. aureus has a high mortality rate of 35%. Therefore, it is crucial to identify the methicillin resistant S. aureus (MRSA) strains and implement the necessary treatment in order to control the spread of hospital infections.

Methods: A total of 150 S. aureus isolates were collected from samples of patients admitted to Alzahra and Shariati hospitals in Isfahan, Iran. Polymerase chain reaction (PCR) for mecA gene was performed in all strains. Thereafter, the minimum inhibitory concentration (MIC) for oxacillin was carried out using agar dilution method. Then, antibiogram using disk diffusion for cephoxitin was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) regulations on isolates containing mecA gene. The three methods were then compared.

Findings: Of the 150 samples, 62 samples (41.33%) were found to carry mecA gene using PCR. However, agar dilution for oxacillin found 56 of 62 samples (90.33%) to harbor mecA gene. Disk diffusion method revealed that 53 of 62 samples (85.48%) contain mecA gene.

Conclusion: Agar dilution method was found to have a higher sensitivity in determining antibiotic sensitivity compared to disk diffusion method. However, PCR was identified as the ideal method for detecting MRSA strains; since a number of strains were found to be sensitive to oxacillin in phenotypic test due to lack of mecA expression while still containing the gene.

Keywords: Staphylococcus aureus, mecA gene, Methicillin, Resistant

Citation: Havaei SA, Moghim Sh, Shahin M, Azimian A, Ghanbari F, Shokri D, et al. **A Comparison between Polymerase Chain Reaction, Oxacillin Agar Dilusion and Cefoxitin Disk Diffusion Methods in Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(232): 466-74

* This paper is derived from a MSc thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Nosocomial Infection Research Center AND Department of Microbiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Patobiology and Anatomy, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnourd, Iran
5- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
6- PhD Student, Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
7- Epidemiologist, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Asghar Havaei PhD, Email: havaei@med.mui.ac.ir