دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۲۸۹ – ۲۸۰ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)
ISMJ 2014; 17(3): 280-289

مقایسه دو روش دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

محسن رضازاده [۱]، رسول یوسفی مشعوف [۲]، حسین سرمدیان [۳]، احسان اله غزنوی‌راد [۱ و ۴*]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۳] گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۶/۱۲- پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۲۹)

چکیده

زمینه: افزایش شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در جوامع مختلف به روشنی دیده می‌شود و این مسئله درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکلات جدی مواجه کرده است. بنابراین این بررسی با هدف مقایسه روش‌های فنوتیپی (روش دیسک دیفیوژن) و ژنوتیپی (روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) جدا شده از بیماران بیمارستان مرکزی شهر اراک انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی توصیفی مقطعی تعداد ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس درمدت یکسال از بیماران بیمارستان مرکزی شهر اراک جداسازی و مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا حساسیت نمونه‌ها نسبت به دیسک سفوکسیتین و اگزاسیلین به‌روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. سپس وجود ژن **mecA** در سویه‌های مذکور با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ارزیابی شد و یافته ها از نظر حساسیت و ویژگی با هم و با استفاده از نرم‌افزار **SPSS** ویرایش ۱۵ و آزمون کای دو مقایسه گردید.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه جدا شده از بیماران، ۷۵ (۷۵ درصد) نمونه به‌روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند، اما در روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، ۸۳ (۸۳ درصد) نمونه نسبت به سفوکسیتین مقاومت داشتند، که البته سه نمونه مقاوم بدون ژن **mecA** بودند، در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ۸۰ نمونه (۸۰ درصد) دارای ژن **mecA** گزارش شد. که به‌ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۹۳/۷۵، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد و۱۰۰، ۸۵، ۱۰۰ درصد بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها، بیانگر این است که روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن هرچند روشی فنوتیپی و ساده می‌باشد اما نسبت به‌روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از حساسیت کمتری برخوردار است و جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) روشی قابل اطمینان نمی‌باشد. همچنین وجود سویه‌هایی با مقاوم نسبت به سفوکسیتین بدون ژن **mecA**، احتمالاً بیانگر بروز نوع دیگری از مقاومت و یا بروز نوعی موتاسیون در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت به متی‌سیلین، دیسک دیفیوژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
Email :e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت، هوازی بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد که در بخش قدامی سوراخ بینی (شایع‌ترین مکان کلونیزاسیون)، پوست به‌ویژه پوست آسیب دیده، واژن، زیر بغل، ناحیه پرینه، ناف نوزادان تازه متولد شده و اوروفارنکس کلونیزه می‌شود (۱ و ۲).

استافیلوکوکوس اورئوس بعد از *اشریشیا کلی* به‌عنوان دومین عامل ایجاده کننده عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌باشد (۱ و ۳) به‌گونه ای که رتبه نخست را در ایجاد عفونت‌های زخم ایجاد شده در اثر جراحی دارد. همچنین دومین علت باکتریمی اولیه بعد از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی (CONS) بوده و شایع‌ترین علت اندوکاردیت (۲۵ الی ۳۵ درصد) در سراسر دنیا می‌باشد. این میکروارگانیسم اغلب باعث آبسه، عفونت‌های جریان خون، عفونت پس از جراحی، و گاهی مرگ ومیر می‌گردد، تخمینی از پژوهش‌های موجود و داده‌های سرشماری نشان می‌دهد که ۱۷۰۰۰ مورد، مرگ ومیر در سال ۲۰۰۸ به‌علت ابتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری رخ داده است (۴).

مهم‌ترین راه انتقال این باکتری به بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها از طریق دست‌های آلوده پرسنل بهداشتی و درمانی است. استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از پاتوژن‌های شایع بیمارستانی می‌باشد که طی سال‌های گذشته میزان شیوع آن‌ها در سرتاسر جهان در حال افزایش است و به‌عنوان یک اپیدمی جهانی شناخته می‌شود (۵ و ۶).

پس از آنکه پنی‌سیلین به‌عنوان نخستین آنتی‌بیوتیک ضد این باکتری‌ها شناخته شد، استافیلوکوکوس اورئوس به واسطه داشتن آنزیم پنی‌سلیناز که از راه پلاسمید منتقل می‌شود نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت آنزیمی پیدا کرد به‌گونه‌ای که امروزه کمتر از ۱۰ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس* به این آنتی‌بیوتیک حساس می‌باشد (۷).

پس از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین، داروهای نیمه صناعی مقاوم به فعالیت‌های آنزیمی (مقاوم به هیدرولیز بتالاکتاماز) همچون نافسیلین، متی‌سیلین و اگزاسیلین ساخته شد، اما پس از مدتی به این آنتی‌بیوتیک نیز مقاومت نشان داد. امروزه فقط ۳۰ تا ۵۰ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور حساسیت نشان می‌دهند (۳).

علت بروز این نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی حضور ژن کروموزومی (*mecA*) در این سویه‌ها می‌باشد، البته این مقاومت توسط ترادفی از ژن‌های موجود در ناحیه‌ای از کروموزوم *استافیلوکوکوس اورئوس* به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (Scc mec) کد می‌گردد. این کاست متشکل از سه قسمت mec complax، ccr و J.region بوده که ژن mecA پروتئین متصل شونده پنی‌سیلین به‌نام PBP2a را کد می‌کند که این محصول باعث می‌شود که *استافیلوکوکوس اورئوس* افینیتی (Affinity) و تمایل کمی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام داشته باشد و در نهایت سویه‌های MRSA را به‌وجود می‌آورد (۸).

نخستین بار در سال ۱۹۶۱ در انگلستان پس از بررسی عفونت ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و مشخص شدن مقاومت این باکتری نسبت به درمان، سویه‌های (MRSA) تعریف شدند (۱ و ۹). امروزه تنها داروی انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها ونکومایسین می‌باشد، البته بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که سویه‌های مقاوم به

ونکومایسین به‌واسطه کسب ژن (van) از انتروکوک‌ها و همچنین تغییر در ساختار دیواره این باکتری‌ها نیز در حال انتشار می‌باشند (۹).

پس از پژوهش‌های گسترده مشخص گردید که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از جمله عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بسیار گسترده در سطح جامعه (MRSA CA) و سطح بیمارستان (HA MRSA) می‌باشد (۳، ۹ و ۱۰).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) که ۷۲ ساعت بعد از پذیرش بیمار در بیمارستان از بیمار جدا می‌شوند، HA MRSA می‌گویند که البته این سویه‌ها حساسیت بیشتری به داروها دارند. سویه‌های HA MRSA دارای Scc mec تیپ‌های I، II و III می‌باشند. و همچنین CA MRSA در واقع به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) اطلاق می‌شوند که از بیمارانی با سابقه حضور کمتر از ۴۸ تا ۷۲ ساعت در بیمارستان جدا شده باشند. و در مقابل این سویه دارای Scc mec تیپ‌های V و IV می‌باشند (۱).

یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد که این امر موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و همچنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان مرگ ومیر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری شده، افزایش هزینه‌های درمان شده است، لذا تشخیص سریع *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و درمان به‌موقع این باکتری جهت جلوگیری از انتشار سویه‌های مذکور از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد (۱، ۳ و ۹).

هدف این بررسی با توجه به توصیه CLSI[1] مبنی بر استفاده از دیسک سفوکسیتین به‌جای اگزاسیلین در روش دیسک دیفیوژن جهت تشخیص مقاومت نسبت به متی‌سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱)، مقایسه روش فنوتیپی (سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین دیسک دیفیوژن) و روش ژنوتیپی (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR) جهت شناسایی روشی سریع و کارآمد برای ردیابی ژن mecA در نمونه‌های جداسازی شده از بیماران مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی- مقطعی صورت پذیرفته است تعداد ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* (خون، سوختگی، مایع مغزی نخاعی، ادرار، مایع مفصلی و غیره) در فاصله زمانی تیرماه ۱۳۹۰ الی تیرماه ۱۳۹۱ از بیماران بستری شده با سنین متفاوت در بخش‌های مختلف بیمارستان مرکزی شهر اراک وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اراک جمع‌آوری گردید. این امر پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و رضایت‌نامه کتبی از بیماران صورت گرفت (که البته تمامی اطلاعات و داده‌های حاصله از نمونه‌های بیماران به‌صورت محرمانه باقی خواهد ماند). در ابتدا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی (رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز اسلایدی، کواگولاز لوله‌ای، تخمیر مانیتول (MSA) و نوکلئاز مقاوم به حرارت (DNase) سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین هویت گردیدند.

سپس پرایمر ۱۰۸bp برای ژن sa442

[1] Clinical Laboratory Standard Institue

5′)F(AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG3′
5′)R(CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA3′

(۹) (تمامی پرایمرها تهیه شده توسط شرکت ژن فن‌آوران تهران می‌باشند) که به‌عنوان مارکر تشخیصی ژنتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد، ساخته شد و نمونه‌ها با روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفته و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تأیید شدند.

در ادامه جهت مشخص کردن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به‌روش فنوتیپی (حساسیت آنتی‌بیوتیکی)، تمامی نمونه‌ها به‌روش دیسک دیفیوژن مطابق با پروتکل (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI 2012 و بر اساس قطر هاله دیسک ۳۰ میکروگرمی سفوکسیتین و دیسک ۱۰ میکروگرمی اگزاسیلین (تمامی دیسک‌ها از شرکت MAST انگلستان تهیه شده بودند) مورد بررسی قرار گرفتند.

بدین‌منظور نمونه‌ها با استفاده ازسواپ استریل در محیط مولر هینتون براث (تمامی محیط‌ها از شرکت Merck آلمان تهیه شده بودند) کشت داده شد، سپس محیط‌ها ۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری، کدورتی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰۸cfu/ml) آماده گردید و با استفاده از سواپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس با پنس استریل دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به‌فاصله ۲۴ میلی‌متر از هم بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد، محیط‌ها ۱۶ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سپری شدن این زمان نتایج حاصله خوانده شد. چنانچه قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین بیشتر از ۲۱ میلی‌متر (>۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین (>۱۳) بیشتر از ۱۳ میلی‌متر بود، نمونه را به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین (MSSA)، و در صورتی که قطر هاله نسبت به دیسک اگزاسیلین کمتر از ۲۱ میلی‌متر (<۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۱۳ میلی‌متر (<۱۳) بود، نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در نظر گرفته شد. مقاومت نمونه‌های مورد نظر نسبت به سفوکسیتین و اگزاسیلین در واقع نشان‌دهنده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، متی‌سیلین، سفالوسپورین‌هاست (۱ و ۵).

در ادامه برای شناسایی ژن مقاومت به متی‌سیلین، ابتدا استخراج DNA سویه‌ها به‌وسیله کیت استخراج تهیه شده از کمپانی (Bioflux-bioer) کره جنوبی صورت پذیرفت و در پایان جهت ردیابی ژن *mec A* از پرایمرهای ۱۶۰bp ساخته شده

5′)F(TCCAGATTACAACTTCACCAGG 3′
5′)′R(CCACTTCATATCTTGTAACG 3

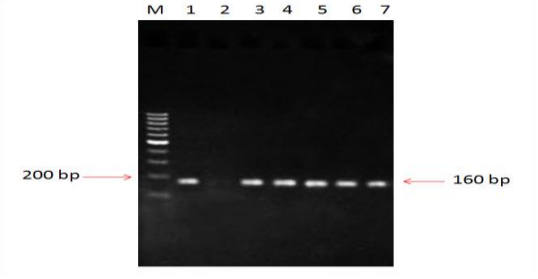
(۹) (تهیه شده توسط شرکت ژن فن‌آوران تهران) استفاده گردید. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، annealing ۵۳ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و extension ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و extension نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه صورت پذیرفت.

مقادیر به‌کار رفته برای هر نمونه در حجم ۵۰ میکرولیتر به‌صورت زیر می‌باشد که ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به‌عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۲۵ میکرولیتر از 2XTaq Master mix (vivantis) و ۲۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده گردید. بعد از اتمام واکنش PCR محصول

PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ شده با safe dye، با ولتاژ ۸۵ به‌مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد. سپس ژل با استفاده از نور ماوراء بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. باندهای DNA به‌دست آمده به‌اندازه ۱۶۰ bp در مقایسه با (DNA size marker 100bp Fermentas) به‌عنوان قطعه مورد نظر از ژن در نظر گرفته شد و وجود سویه‌های MRSA تأیید گردید (شکل ۱). در این مطالعه از نمونه کنترل مثبت ۴۹۴۷۶: ATTC استفاده شد و در ادامه این تحقیق نتایج به‌دست آمده از ارزیابی مقاومت نمونه به متی‌سیلین به دو روش فنوتیپی (روش دیسک دیفیوژن) و ژنوتیپی (PCR) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. حساسیت و ویژگی هر روش با استفاده از نرم‌افزار SPSS (USA، Il،Chicago،SPSS Inc) ویرایش ۱۵ و با استفاده از آزمون کای دو محاسبه گردید. (P<۰/۰۵) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد (۱۱).

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان، تعداد ۷۵ نمونه (۷۵ درصد) به‌روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، نسبت به اگزاسیلین مقاوم بوده و ۲۵ نمونه دارای حساسیت نسبت به اگزاسیلین بودند، در حالی که پس از بررسی با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، تعداد ۸۳ نمونه (۸۳ درصد) نسبت به سفوکسیتین مقاوم بودند که البته سه نمونه مقاوم فاقد ژن *mecA* بود، و ۱۷ نمونه نسبت به سفوکسیتین حساس بودند اما در بررسی انجام شده به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تعداد ۸۰ نمونه (۸۰ درصد) واجد ژن *mecA* بودند. اما با توجه به اینکه روش PCR از طرف CLSI به‌عنوان استاندارد طلایی شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) معرفی شده است (۱۲ و ۱۳)، بنابراین نتایج حاصله از روش دیسک دیفیوژن با این روش مقایسه شدکه به‌ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۹۳/۷۵، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد بودند (جدول ۲).



شکل ۱) تصویر ژل الکتروفورز ژن *mecA* حاوی باند ۱۶۰. (۱) چاهک M: مارکر (۲) چاهک ۱: کنترل مثبت (نمونه کنترل مثبت ATTC:۴۹۴۷۶ می‌باشد) (۳). چاهک ۲: نمونه فاقد *mecA* (۴) چاهک ۳ الی ۷: نمونه‌های *mec A* مثبت می‌باشند.

جدول ۲) توزیع فراوانی MRSA و مقایسه حساسیت و ویژگی روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در نمونه‌های جدا شده از بیماران

روش‌ها	شده MRSA ردیابی	حساسیت	ویژگی	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی
اگزاسیلین دیسک دیفیوژن	۷۵	٪۹۳/۷۵	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۸۰
سفوکسیتین دیسک دیفیوژن	۸۳	٪۱۰۰	٪۸۵	٪۹۶/۳۹	٪۱۰۰
PCR	۸۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

بحث

در بررسی پیش رو، به ارزیابی عملکرد روش فنوتیپی (اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن) و روش ژنوتیپی (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تعیین ویژگی و حساسیت روش‌های فوق در مشخص کردن سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) پرداخته شد.

طی سالیان گذشته مؤسسه استاندارد CLSI تلاش‌های گسترده‌ای برای افزایش دقت و بهبود روش‌های به‌کار گرفته شده در شناسایی و تشخیص سویه‌های MRSA انجام داده است. تعیین سریع و دقیق وجود مقاومت نسبت به متی‌سیلین، کشف و ردیابی ژن *mec A* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت شناسایی و درمان به‌موقع بیماران آلوده به این باکتری از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است و توجه به این مسئله می‌تواند گام بسیار مهمی در جهت پیش آگهی و کنترل عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد (۲ و ۵).

با این حال گزارش‌های برجسته‌ای مبنی بر وجود خطا و اشتباه در شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در روش‌های فنوتیپی وجود دارد. هم اکنون، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌عنوان استاندارد طلایی در جهت شناسایی ژن *mecA* از سوی CLSI (۲۰۱۲) معرفی شده است. (۹). بنابراین با توجه به بالا بودن هزینه‌های این روش و نیازمند بودن به کادر مجرب و همچنین عدم انجام آن به‌صورت معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، پژوهشگران بررسی‌های گسترده‌ای در زمینه شناسایی روشی ساده، کم هزینه و سریع جهت جایگزینی مناسب برای روش مذکور انجام داده‌اند.

تحقیق آناد (Anad) و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که از بین ۵۰ نمونه بررسی شده به‌روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، ۳۲ نمونه نسبت به سفوکسیتین مقاوم بوده و همه ۳۲ نمونه پس از بررسی با روش PCR دارای ژن mec A بودند اما در روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، ۲۸ نمونه نسبت به اگزاسیلین دارای مقاومت بودند (۱۴).

در مطالعه نفیسی و همکاران در سال ۱۳۸۶ از بین ۵۲ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ۲۳ (۴۴ درصد) مورد به‌روش فنوتیپی نسبت اگزاسیلین مقاوم بودند در حالی که ۲۷ (۵۲ درصد) مورد از ۵۲ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده واجد ژن *mecA* بودند (۱۵).

در مطالعه پرامودهنی (pramodhini) و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۵۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* از آبسه‌های عمیق و سطحی جداسازی شد. در این بررسی ۲۰ (۳۶/۴ درصد) نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش PCR شناسایی شد. اما در مقایسه با روش PCR و روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن که دارای ویژگی و حساسیت (۱۰۰ درصد) می‌باشند، روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن دارای ویژگی (۱۰۰ درصد) و حساسیت (۹۰ درصد) و همچنین دارای ویژگی می‌باشد.

تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به‌وسیله روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین دیسک دیفیوژن ساده و نسبتاً ارزان است و می‌تواند به‌عنوان جایگزین برای روش PCR استفاده شود (۱۶).

علی‌قلی و همکاران ۱۶۰ (۴۷ درصد) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* را از بیمارستان امام خمینی تهران جداسازی کرده و با روش فنوتیپی مقاوم به اگزاسیلین تشخیص دادند. در حالی که به‌روش PCR ۱۶۲ سویه (۴۸ درصد) دارای ژن *mecA* بودند (۱۷).

در مطالعه سانکاک (Sancak) و همکاران در سال ۲۰۰۳ تعداد ۴۰۶ نمونه استافیلوکوک از بیماران بیمارستان حاجت تپه جداسازی شد که ۲۴۸ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۱۵۸ نمونه استافیلوکوک کوآگولاز منفی بودند. در این بررسی روش دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ویژگی و حساسیت

۱۰۰ درصد بود، اما برای استافیلوکوک کوآگولاز منفی دارای ویژگی (۷۹ درصد) و حساسیت (۱۰۰) بود. اگر چه روش دیسک دیفیوژن به‌عنوان روشی قابل اعتماد برای تشخیص مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، اما نمی‌تواند همان موفقیت را در تشخیص استافیلوکوک کوآگولاز منفی داشته باشد (۱۸).

کاژمارک (Kaczmarek) و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطالعه خود را بر روی ۱۲۰ نمونه جدا شده از بیماران بیمارستان تورون انجام دادند. در این تحقیق ۶۰ نمونه (۵۰ درصد) با روش PCR واجد ژن *mecA* بودند. اما روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن در مقایسه با PCR دارای ویژگی (۹۳/۳ درصد) و حساسیت (۹۵ درصد) بود و همچنین روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن دارای ویژگی (۱۰۰ درصد) و حساسیت (۹۶ درصد) بود. یافته‌ها نشان داد که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به آگزاسیلین دیسک دیفیوژن برای تشخیص MRSA روش مناسب‌تری می‌باشد (۱۹).

مطالعه ایراز (Iraz) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با هدف مقایسه روش‌های مختلف فنوتیپی: انتشار دیسک، غربالگری اگزاسیلین آگار، لاتکس آگلوتیناسیون و سیستم خودکار BD جهت تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) انجام شد. حضور ژن *mecA* از طریق PCR به‌عنوان نشانگر مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن، ۲۱۴ نمونه مقاوم به متی‌سیلین با روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، غربالگری اگزاسیلین آگار، لاتکس آگلوتیناسیون و سیستم خودکار BD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. که بر این اساس در تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به‌روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، روشی مفیدتر می‌باشد. اما به‌طور کلی روش سیستم خودکار BD موفق‌تر از سایر روش‌های فنوتیپی بود (۲۰ و ۲۱).

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می‌دهد که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن روشی نسبتاً کارآمد، کم هزینه و بسیار ساده است، توان انجام در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌صورت معمول را دارد و جهت غربالگری اولیه برای شناسایی سویه‌های MRSA مناسب می‌باشد.

روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن با توجه به نتایج منفی کاذب نمی‌تواند روشی جایگزین برای روش ژنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های MRSA باشد. اما با توجه به کم هزینه بودن انجام‌آزمایش می‌تواند برای غربالگری اولیه به‌کار گرفته شود، با این وجود که نیازمند آزمایشی تأییدی می‌باشد. از این رو، روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن در تشخیص MRSA، مفیدتر از روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن می‌باشد و به‌طور کلی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌عنوان استاندارد طلایی در جهت شناسایی ژن *mecA* از طرف CLSI معرفی شده است و به همراه سفوکسیتین دیسک دیفیوژن جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین روش‌های قابل اعتمادی می‌باشند.

اما مسئله ارزشمند در بررسی کنونی این است که با توجه به اینکه مؤسسه استاندارد CLSI روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن را برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به‌عنوان روشی قابل اطمینان معرفی کرده است اما در این مطالعه با استفاده از روش مذکور سویه‌هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند که دارای مقاومت نسبت به

سفوکسیتین بودند اما پس از بررسی با روش PCR مشخص شد که فاقد ژن *mec A* می‌باشند. این یافته بیانگر نکته‌ای مبهم و مهم می‌باشد که آیا نتایج حاصل شده می‌تواند دلیلی بروز احتمالی نوعی مقاومت جدید و یا ایجاد نوعی موتاسیون در ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس* نظیر ناحیه ژن *mec A* باشد که البته شناسایی آن از اهمیت به‌سزایی برخوردار خواهد بود. امید می‌رود که در مطالعات بعدی علت بروز چنین یافته‌هایی شناسایی گردد.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران بخش میکروب‌شناسی بیمارستان ولی عصر اراک به‌خصوص سرکار خانم مرضیه رنجبران و آقای مسعود صرافیان که ما را در انجام این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. از معاونت محترم آموزش دانشگاه به‌دلیل حمایت مالی این طرح نیز قدردانی می‌گردد.

References:

1.Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi S, et al. Predominance and Emergence of Clones of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Malaysia. JCM 2010; 48: 867-72.
2.Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcusaureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-20.
3.Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus immune evasion and virulence. J Mol Med 2010; 88: 109-14.
4.Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States. JAMA 2007; 298: 1763-71
5.Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of meticillin resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet 2006; 368: 874-85.
6.Emmerson AM, Enstone JE, Griffin M, et al. The second national prevalence survey of infection in hospitals-overview of the results. J Hosp Infect 1996; 32: 175-90
7.Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 3057-71.
8.Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with b-lactam resistance in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 1984; 158: 513-6.
9.Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, et al. A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcaldiscrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in meticillinresistant Staphylococcus aureus. JCM 2010; 59: 1135-9.
10.Morell EA, Balkin DM.. Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. Yale J Biol Med 2010; 83: 223-33.
11.Venkatakrishna R, Kishore B, Manohar K, et al. Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus: Comparison of Disc diffusion and MIC with mecA gene detection by PCR. IJPBS 2011; 1: 518-21.
12.Siripornmongcolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, et al.Evaluation of different primers for detecting mecA gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33: 758-63.
13.Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-18.
14.Anand KB, Agrawal P, Kumar S, et al. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol 2009; 27: 27-9.
15.Kalhor H, Shariati L, Validi M, et al. Comparison of Agar screen and duplex-PCR methods in determination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from nasal carriage. Afr J Microbiol Res 2012; 6: 3722-6.
16.Pramodhini S, Thenmozhivalli PR, Selvi R,

et al. Comparison of Various Phenotypic Methods and mecA Based PCR for the Detection of MRSA. J Clin Diagn Res 2011; 5: 1359-62.
17.Hashemi F, Shahsavan Sh, Jebel Ameli F, et al, edithors. The pattern of antibiotic resistance of Staphylococcus aureus strains isolated from clinical sample in Imam Khomeini hospital of Tehran. Proceedings of the 8th congress of microbiology, Iran. 2006; 22-24: 91.
18.Sancak B, Ercis S, Hasçelik G. Comparison of the value of disk diffusion methods and polymerase chain reaction for fixation of methicillin resistant staphylococcus .Mikrobiyol Bul 2003; 37: 109-15.
19.Kaczmarek A, Budzyńska A, Mikołajczyk D, et al. Comparison of disk-diffusion method and PCR for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains. Med Dosw Mikrobiol 2006; 58: 87-93.
20.Iraz M, Tekerekoglu MS, Otlu B, et al. Comparison of an automated system with four phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Afr J Microbiol Res 2012; 6: 764-9.
21.Ghaznavi-Rad E, Amouzandeh-Nobaveh A. Comparison of molecular methods in epidemiological typing of methicillin resistance Staphylococcus aureus. ISMj. In press 2012.

ISMJ 2014; 17(3): 280-289

Original Article

Comparison of Disk Diffusionand "PCR" methods for determination of Methicillin- resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) strains

M. Rezazadeh [1], R. Yousefi Mashouf [2], H. sarmadyan [3], E. Ghaznavi-Rad [1,4]*

[1]Department of Microbiology and immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN
[2]Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences , Hamadan, IRAN
[3]D epartment of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN
[4]Molecular research center, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

(Received 2 Sep, 2012 Accepted 19 Nov, 2012)

Abstract

Background: Increasing prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different communities is clearly visible .Because of this, treatment of patients with infections caused by those bacteria has fallen into critical troubles .Current study, therefore, is aimed to compare phenotypic (disk diffusion) and genotypic (PCR) methods for fast diagnosis of methicillin-resistant strains, isolated from patients of Arak Central Hospital

Materials and Methods: In a cross sectional study whithin one year of period , a total of 100 samples were taken and tested from the patients of Arak hospital (located in the central part of Iran) . Isolates' sensitivity to Cefoxitin Disk and Oxacillin was confirmed through disk diffusion. Using PCR , the isolates were tested for the presence of *mecA* gene. Results were compared from the points of sensitivity and specificity by application of chi square test in SPSS software..

Results: Seventy five (75%) out of the total 100 samples (through oxacillin disk diffusion method , already isolated from patients were resistant to oxacillin. Meanwhile, 83(83%) of cefoxitin disk diffusion method samples' were resistant to cefoxitin .Three resistant samples to cefoxitin were negative for mecA gene and 80 (80%) samples were positive for mecA gene using PCR. Sensitivity were respectively 93.75% , 100% , and specificity were 100% and 100% , 85% , 100

Conclusion: Findings indicate that oxacillin disk diffusion method is a simple phenotypic method, however, it has lower sensitivity compared to cefoxitin disk diffusion and polymerase chain reaction (PCR) methods. Therfore, it is not recommended for detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Existence of strains resistant to cefoxitin without *mecA* gene, shows the outset of another type of resistance or mutation in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) .

Key words : *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant, disk diffusion, polymerase chain reaction

***Address for correspondence*: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir.