مقایسه روش های Agar screen و Duplex- PCR در تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بینی پرسنل درمانی بیمارستان هاجر شهرکرد، بهار ۱۳۸٦

دکتر محمدرضا نفیسی[1*]، حوریه کلهر[2]، دکتر بهنام زمانزاد[3]، دکتر علی کریمی[4]، عفت فرخی[5]، مجید ولیدی[6]

۱-استادیار، دکتری تخصصی میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۲- مربی، کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۳- دانشیار، متخصص میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۴- دانشیار، دکتری تخصصی ویروس شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۵- مربی، کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۶- مربی ، کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

تاریخ دریافت ۸۶/۷/۳۰ ، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۲/۸

چکیده

مقدمه: سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) معضلی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی شده‌اند. تست‌های روزمرهٔ تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به علت خاصیت ناهمگنی این نوع مقاومت، برای تعیین سویه‌های مزبور توصیه نمی‌شوند. هدف از این تحقیق مقایسه یک روش فنوتیپی با ژنوتیپی در تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت به متی سیلین در نمونه‌های بینی پرسنل درمانی بیمارستان است.

روش کار: در این تحقیق تجربی، تعداد ۵۲ استافیلوکوک کواگولاز مثبت جدا شده با روش سرشماری از بینی ۲۰۴پرسنل درمانی بخش‌های مختلف بیمارستان آموزشی هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، به دست آمد. حساسیت سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین با روش فنوتیپی agar screen ارزیابی شد. سپس در آنها وجود ژن عامل مقاومت به متی سیلین (mecA) با روش مولکولی duplex PCR بررسی و نتایج مورد مقایسه قرار گرفتند و حساسیت ویژگی روش، تعیین گردید.

نتایج: ۲۳ مورد از ۵۲ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده (۴۴درصد) به لحاظ فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند، ولیکن ۲۷ مورد از۵۲ ایزوله مزبور (۵۲ درصد) واجد ژن mecA بودند. این مطالعه نشان داد که روش فنوتیپی agar screen در مقایسه با روش ژنوتیپی PCR برای تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۸۱/۵ و ۹۶ درصد می‌باشد.

نتیجه گیری: روش oxacillin agar screen در مقایسه با duplex PCR، روشی فنوتیپی ساده، کم هزینه و کاربردی است که با داشتن جواب‌های مثبت کاذب نسبتاً پائین، برای تائید سویه‌های مشکوک مقاوم به متی سیلین مناسب است ولی با داشتن جواب‌های منفی کاذب نسبتاً بالا، جهت غربال‌گری اولیه سویه‌های MRSA از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان‌ها مناسب نمی باشد.

واژگان کلیدی: عفونت‌های بیمارستانی، مقاومت به متی سیلین، استافیلوکوکوس اورئوس، واکنش زنجیره ای پلیمراز

***نویسنده مسئول:** شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
E.mail: mrnafisi@yahoo.com

مقدمه

طی ۴۰ سال گذشته عفونت‌های MRSA در بیمارستان‌های کشورهای توسعه یافته نظیر ایالات متحده و اروپا و نیز کشورهای در حال توسعه به صورت آندمیک در آمده‌اند(۱). در ایالات متحده سالیانه از هر دو میلیون عفونت بیمارستانی، ۲۶۰۰۰۰ مورد به علت استافیلوکوکوس اورئوس است. متاسفانه در بین آنها درصد سویه‌های مقاوم به متی سیلین رو به فزونی هستند، به طوری که سویه‌های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۴/۸درصد در سال ۱۹۸۷ به ۳۹/۷ درصد در سال ۱۹۹۸ افزایش یافته‌اند(۲). این معضل گریبان‌گیر کشور ما نیز هست، به طوری که طی تحقیقی نشان داده شد که ۳۸/۶ درصد استافیلوکوک‌های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران را سویه‌های MRSA تشکیل می‌دهند(۳).

استافیلوکوکوس اورئوس ازعوامل مهم عفونت‌های جدی پوست و بافت‌های نرم و هم‌چنین عفونت‌های تهاجمی است که از بیمارستان یا جامعه کسب می‌شوند(۴). مقاومت نسبت به پنی سیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، یک سال پس از کشف آن توسط ریمل کمپ گزارش شد (۵). این مقاومت در رابطه با آنزیم بتالاکتاماز بود که ژن آن در پلاسمید مربوطه کد شده است. لذا گسترش آن بسیار سریع اتفاق افتاد و درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مزبور را با مشکل مواجه ساخت. در سال ۱۹۶۰ سنتز پنی سیلین مقاوم به پنی سیلیناز (PRP) نیمه صناعی، نوید درمان موفقیت آمیز را داد. اما کمتر از یک سال پس از آن، در انگلستان گزارش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین داده شد(۶). سویه‌هائی که در ابتدا در بیمارستان‌ها یافت شدند ولی بزودی در سطح جامعه گسترش یافتند(۵).

ماهیت مقاومت به متی سیلین در سویه‌های استافیلوکوک، ویژگی ناهمگن[1] دارد. یعنی کمتر از یک سلول در بین ۱۰۰ سلول، مقاومت را در سطح بالائی بیان می‌کند(۲). مکانیسم مقاومت ناهمگن سویه‌های MRSA به طور کامل شناخته نشده است. گرچه وجود ژن کروموزومی mecA که برای پروتئین PBP2a کد شده است، الزامی است(۲، ۶) ولی در تنظیم میزان بیان آن دو گروه از عوامل دخالت دارند؛ گروه اول محصولات ژن‌های دیگری هستند نظیر femA که در سنتز پپتیدوگلیکان درگیر می‌باشند و گروه دوم، شرایط محیطی نظیر اسمولاریته محیط کشت (مثل غلظت NaCl)، درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون و غیره می‌باشند(۲، ۹-۷). علیرغم توصیه‌های NCCLS در تعیین حساسیت سویه‌های MRSA ، ممکن است در بین جمعیتی از باکتری‌هائی که به لحاظ فنوتیپی حساس به متی سیلین هستند، درصد کمی حامل ژن mecA باشند. این ایزوله‌ها می‌توانند مقاومت به شدت ناهمگنی را نشان دهند، به طوری که کمتر از یک سلول با مقاومت بالا در بین جمعیتی از 10^8 سلول حساس وجود داشته باشد(۲). لذا تعیین حساسیت درهمه سویه‌های MRSA با روش‌های معمول میکروبیولوژی و فراهم ساختن شرایطی بهینه برای همه آنها، مشکل و گاهی غیر ممکن است(۱۰).

شواهد نشان می‌دهند که سویه‌های mecA-positive MRSA با مقاومت فنوتیپی ناهمگن، طی انکوباسیون با متی سیلین به سمت سویه‌های مقاوم همگن پیشروی می‌کنند(۶). هم‌چنین تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاه نشان داده‌اند که اگر ایزوله‌های mecA-positive MRSA باخاصیت فنوتیپی حساس به متی سیلین، در معرض آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام قرارگیرند، موجب افزایش MIC آنها نسبت به اگزاسیلین می‌شود[2]. لذا این خطر وجود دارد که تجویز آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام موجب انتخاب باکتری‌های به شدت مقاوم در بین جمعیتی از باکتری‌های حساس شود و نهایتاً درمان را دچار شکست کند(۲). موضوع حائز اهمیت دیگر، پروتئین‌های تغییر یافته PBP2a هستند که گرایش کمی برای اتصال به آنتی

[1] - Heterogenous.

[2] - Oxacillin MIC≥4µg/ml.

بیوتیک‌های بتالاکتام دارند و لذا نه تنها سبب مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها بتا لاکتام از جمله پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها می‌شوند بلکه حتی در مقابل آنتی بیوتیک‌های نیمه صناعی مقاوم به بتالاکتاماز نظیر متی سیلین، اگزاسیلین، نف سیلین نیز مقاوم خواهند بود(۵). متاسفانه اغلب استافیلوکوک‌های با مقاومت ناهمگن[1] نسبت به عوامل ضد باکتریایی متعدد نظیر بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها، کلیندومایسین و تتراسیکلین مقاوم می‌باشند(۱۱،۱۲).

از آنجائی که ژن mecA در سویه‌های استافیلوکوک حساس به متی سیلین یافت نمی‌شود(۱۱)، لذا روش‌های مولکولی PCR و هیبریدیزاسیون که ژن mecA را تعیین می‌کنند، روش‌های استاندارد طلائی محسوب می‌شوند(۱۰، ۱۱). جهت تائید فرآورده حاصل از روش‌های PCR، در اوایل به لکه گذاری ساترن[2] نیاز بود. اما در حال حاضر با روش‌های duplex PCR و یا multiplex PCR تائید بعدی محصول PCR، منتفی شده است. به عنوان مثال برای ژن‌های نوکلئاز(nuc)، کوآگولاز(coa)، پروتئین A (spa)، femA و femB، Sa442، 16S rRNA و پروتئین سطحی متصل شونده به فیبرینوژن سویه‌های MRSA، پرایمرهائی ساخته شده است که همزمان با پرایمرهای مربوط به ژن mecA در روش duplex PCR به کار می‌روند(۱۰).

هدف از این تحقیق ارزیابی میزان کارآئی روش oxacillin agar screen در شناسائی سویه‌های MRSA جدا شده از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان و مقایسه آن با duplex PCR به عنوان روش استاندارد طلائی بود. از اهداف دیگر این تحقیق، تعیین فراوانی سویه‌های MRSA در پرسنل درمانی بیمارستان هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی چهار محال و بختیاری واقع در شهرکرد بود. پرسنل درمانی بیمارستان‌ها یکی از مخازن بالقوه عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند(۱). لذا این تحقیق می‌تواند به لحاظ اپیدمیولوژی اطلاعات پایه‌ای را در رابطه با خطر بالقوه عفونت‌های بیمارستانی فراهم سازد.

روش کار

در این تحقیق تجربی، به روش سرشماری، تعداد ۲۰۴ نمونه از قسمت قدامی بینی پرسنل داوطلب شرکت در تحقیق، از بخش‌های مختلف بیمارستان آموزشی هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد جمع‌آوری وبه آزمایشگاه میکروب شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انتقال یافت. استافیلوکوک‌های جدا شده با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب شناسی شامل گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر ماتیتول(MSA) و DNase تعیین هویت شدند. برای تعیین حساسیت نسبت به متی سیلین، بنا بر توصیه‌های NCCLS از اگزاسیلین استفاده شد که در شرایط آزمایشگاهی پایدارتر از متی سیلین است و نیز قادر به تشخیص مقاومت تقاطعی می‌باشد. هم چنین روش agar screen استفاده شد که نسبت به کاستی‌های دیسک دیفیوژن ارجح‌تر است(۱۲). تعیین حساسیت با تلقیح CFU 10^4 از باکتری مورد نظر بر روی محیط مولر-هینتون آگار(مرک - آلمان) حاوی ۴ درصد کلرور سدیم و ۶ میلی گرم بر لیتر اگزاسیلین(مرک - آلمان) انجام گرفت. رشد باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بررسی شد(۱۲). در این تحقیق جهت شناسایی ژن عامل مقاومت به متی سیلین ازپرایمرهائی استفاده شد که برای نواحی نوکلئوتیدی بسیار حفاظت شده در ژنوم استافیلوکوک‌ها طراحی شده‌اند و توسط شرکت سینا ژن(تهران) تهیه گردید(جدول ۱).

این پرایمرها، قطعه‌ای به اندازه ۳۱۰bp از ژن mecA و۴۷۹bp از ژن 16S rRNA را تکثیرمی‌نمایند. در این مطالعه از ژن 16S rRNA استافیلوکوک برای تأیید محصول PCR ژن mecA استفاده شد.

برای استخراج DNA باکتری، از کیت DIATOM DNA PREP 100 استفاده گردید (تمام معرف های آزمون PCR ازشرکت ژن فن آوران ایران تهیه

[1] - Oxacillin-resistant.
[2] - Southern blotting.

شد). مقادیر به کار رفته برای هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر به قرار زیر بود؛ یک میکرولیتر ازDNA استخراج شده باکتری (به غلظت ۱۰ نانومتر)، ۲/۵میکرولیتر بافر 1XPCR، ۰/۵میکرولیتر MixedNTP (به غلظت ۲۰۰ میکرومول)، ۲میکرولیتر $MgCl_2$ (به غلظت ۴ میلی مول)، ۱ میکرولیتر پرایمر mecA1(f) (به غلظت ۰/۴ میکرومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر mecA2 (R) (به غلظت ۰/۴ میکرومول)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر 16S rRNA X (F) (به غلظت ۰/۱ میکروگرم)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر 16S rRNA Y(R) (به غلظت ۰/۱ میکروگرم)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز (به غلظت یک واحد) و ۱۶/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل. سپس این مخلوط در دستگاه ترموساکلیر با برنامه زیر و به تعداد ۳۰ سیکل قرار داده شد:

مرحله pre denaturation به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله denaturation به مدت ۴۵ ثانیه در دمای۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله annealing به مدت ۴۵ ثانیه در دمای۵۹ درجه سانتی گراد، مرحله extension به مدت ۵ دقیقه در دمای۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله post extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد.

بعد از اتمام واکنش duplex PCR محصول آن روی ژل پلی اکریل امید ۸ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، باندهای DNA به اندازه ۳۱۰bp مربوط به ژن mecA و ۴۷۹bp مربوط به ژن 16S rRNA در سویه های مقاوم و سویه استاندارد ATCC 33591 استافیکوکک اورئوس به عنوان باکتری مرجع مقاوم به متی سیلین، قابل رویت گردید. در سویه‌های حساس و سویه ATCC 29213 استافیلوکک اورئوس به عنوان باکتری رفرانس حساس به متی سیلین، تنها باند bp ۴۷۹ مربوط به ژن 16S rRNA دیده شد(شکل ۱). در نهایت حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، و میزان کارآمدی روش، محاسبه گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسائی ژن mecA

پرایمر	توالی های ´۵ به ´۳	موقعیت
meca1(F)	GAT GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	318-342
meca2(R)	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	603-627
16S rRNA (x)	GGA ATT CAA ATG AAT TGA CGG GGG	911-930
16S rRNA(Y)	CGG GAT CCC AGG CCC GGG ACC GTA TTC AC	1371-1399

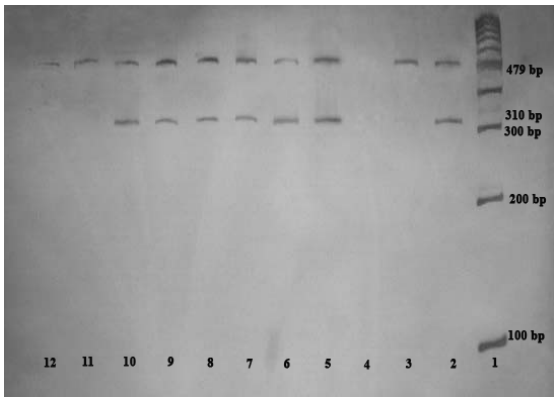
نتایج

از ۲۰۴ استافیلوکوک جدا شده، ۵۲ سویه کواگولاز مثبت (۲۵/۵درصد) بودند. که از بین آنها ۲۳ سویه (۴۴درصد) با روش فنوتیپی agar screen نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند. در حالی که با استفاده از روش duplex PCR، ۲۷ سویه (۵۲ درصد) واجد ژن mecA بودند. بنابراین از۲۷ سویه کواگولاز مثبت حاوی ژن mecA تنها ۲۲ سویه با روش فنوتیپی agar screen به عنوان مقاوم به متی سیلین ارزیابی شدند. بدین ترتیب ۵ سویه واجد ژن mecA با روش فنوتیپ agar screen حساس به اگزاسیلین و یک سویهٔ فاقد ژن mecA مقاوم به اگزاسیلین تشخیص داده شد.

در نهایت حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و میزان کارآمدی به ترتیب ۸۱/۵، ۹۶، ۹۵/۶، ۸۲/۷ و ۸۸/۵ درصد محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اگزاسیلین (متی سیلین)

ژنوتیپ / فنوتیپ	مثبت	منفی	جمع
مقاوم	۲۲	۱	۲۳
حساس	۵	۲۴	۲۹
جمع	۲۷	۲۵	۵۲



شکل ۱. ژل الکتروفورز شده حاوی باندهای bp ۳۱۰ و bp ۴۷۹ تکثیر شده ژن mecA و 16S rRNA بهمراه مارکر(۱)، سویه رفرانس مقاوم ATCC 33591 استافیلوکک اورئوس(۲)، سویه رفرانس حساس ATCC 29213 استافیلوکک اورئوس (۳) و چاهک بدون نمونه(۴) چاهک‌های ۵ الی ۱۰ نمونه‌های مقاوم و چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ نمونه های حساس به اگزاسیلین

بحث

فراوانی ژن mecA در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نقاط مختلف جهان و ایران متفاوت گزارش شده است (۳-۱). این اختلافات می‌توانند ناشی از توزیع واقعاً متفاوت ژن مزبور در مکان‌های مختلف و یا مربوط به روش تعیین آنها باشد. ولی موضوع مشترک در بین تمام این تحقیقات، گستردگی زیاد ژن mecA درجهان است که نشان از خطر بالقوه‌ای از رخداد عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اگزاسیلین (متی سیلین) و طیف وسیعی ازدیگر آنتی بیوتیک‌ها در دنیا می‌باشد. این تحقیق نیز نشان داد که بیمارستان هاجر شهرکرد از این واقعیت مستثنی نبوده و وجود ژن مزبور در ۵۲ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در بین پرسنل درمانی بیمارستان می‌تواند هشدار دهنده باشد.

NCCLS سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با MIC ≥ ۲ میکروگرم در میلی لیتر را حساس و MIC ≥ ۴ میکروگرم در میلی لیتر را مقاوم به متی سیلین ارزیابی می‌کند(۱۲). نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی مقاومت به اگزاسیلین در این تحقیق، ۵ مورد حساس کاذب و یک مورد مقاوم کاذب را نشان دادند.

تحقیق ساکولاس و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که از ۲۰۳ ایزوله استافیلوکوک، دو واجد ژن mecA با روش فنوتیپی agar screen حساس ارزیابی می‌شوند(۲). در سال ۱۳۸۵نیک بخت و همکاران در تبریز با مطالعه بر روی ۲۰۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۷۷ سویه (۳۷/۴درصد) را با روش agar screen مقاوم به متی سیلین تشخیص دادند در حالی که ۸۰ سویه (۳۸/۸ درصد) با روش PCR مقاوم به متی سیلین گزارش شدند(۱۳). علی قلی و همکاران ۱۶۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس (۴۷ درصد) جدا شده در بیمارستان امام خمینی تهران را با روش فنوتیپی مقاوم به اگزاسیلین تشخیص دادند در حالی که به روش PCR، ۱۶۲ سویه (۴۸ درصد) دارای ژن mecA بودند(۱۴). میرصالحیان و همکاران دربیمارستان دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران، یک سویه از استافیلوکوک کواگولاز مثبت واجد ژن mecA را با روش دیسک دیفیوژن به عنوان حساس ارزیابی کردند(۳). شاید مقاومت ناهمگن در بین سویه‌های MRSA باعث شده است که روش‌های فنوتیپی قادر به تشخیص سویه‌های با بیان ضعیف ژن mecA، نباشند. بنابراین برای تشخیص این سویه‌ها، کارآئی روش‌های مختلف و یا یک روش در شرایط یا مکان‌های مختلف، متفاوت است.

گرچه روش oxacillin agar screen که در این تحقیق به کار رفت، توصیه شده توسط NCCLS بود،

ولیکن حساسیتی برابر با ۸۱/۵ درصد داشت که در مقایسه با تحقیقات دیگران از حساسیت پائینی برخوردار بود. این اختلاف شاید به خاطر تفاوت در سویه‌ها و یا ماهیت نمونه‌ها باشد. ساکولاس و همکاران در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که مقاومت ناهمگن حتی در بین ایزوله‌های استافیلوکوکس اورئوس با منابع پاتولوژیک مختلف، نظیر خون، خلط، زخم، چشم و غیره نیز متفاوت است (۲، ۱۵). چنان که ملاحظه می‌شود تحقیق‌های یاد شده بر روی نمونه‌های پاتولوژیک بیماران انجام شده‌اند، در صورتی که این تحقیق بر روی نمونه‌های بینی ناقلین سالم انجام شد. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که agar screen حساسیت پائینی در غربال‌گری اولیه سویه‌های MRSA از بینی ناقلین سالم دارد و نتایج منفی کاذب نسبتاً زیاد آن احتمالاً به خاطر ناتوانی در تشخیص سویه‌های MIC≤4µg/ml باشد که بعنوان حساس به متی سیلین ارزیابی می‌شود.

از طرف دیگر در این تحقیق ایزوله‌ای فاقد ژن mecA دیده شد که به لحاظ فنوتیپی به اگزاسیلین مقاومت نشان داد. سایر محققین نیز با موارد مشابه برخورد داشته‌اند، مثلاً سکوسکا در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای بر روی ۲۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت به متی سیلین را با روش‌های فنوتیپی و PCR تعیین کرد و سه سویه فاقد ژن mecA را با روش فنوتیپی مقاوم به متی سیلین گزارش کرد(۱۵). تولید بیش از حد بتا لاکتاماز، یا تولید پروتئین‌های PBP طبیعی باتغییر توانائی اتصال و یا عوامل ناشناخته دیگر، می‌توانند سطح پائینی از مقاومت به متی سیلین در سویه‌های استافیلوکک اورئوس فاقد ژن mecA را به وجود آورند(۱۱).

میرصالحیان، روش دیسک دیفیوژن و PCR را در شناسایی سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین با یکدیگر مقایسه کرد و حساسیت ۹۲/۸۵درصد گزارش نمود(۳). به نظر می‌رسد که روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن نسبت به agar screen دارای حساسیت بالاتری است. ساکولاس و همکاران و هم‌چنین والت و همکاران در دو تحقیق جداگانه روش‌های agar dilution MIC را با PCR مقایسه کردند و به ترتیب حساسیتی برابر با ۹۹ درصد و ۹۶ درصد به دست آوردند(۲، ۱۱). با توجه به نتایج منفی کاذب که در این تحقیق به دست آمد، به نظر می‌رسد روش agar screen دارای کارآئی کمتری نسبت به روش‌هائی است که MIC را تعیین می‌کنند. گرچه تست‌های مولکولی تعیین ژن مقاومت mecA، روش استاندارد طلائی محسوب می‌شوند(۱۰، ۱۱) اما به دلایلی نظیر نیاز به امکانات ویژه، هزینه بالا و پرسنل مجرب، امکان انجام آن به طور روزمره در آزمایشگاه‌های معمولی وجود ندارد و لذا برای تست‌های روتین، روش‌های تعیین MIC نظیر سریال دایلوشن، آگار دایلوشن و E test جایگزین مناسب روش‌های مولکولی می‌باشند و می‌توان آنها را توصیه کرد. به هر حال با عنایت به نتایج این تحقیق که ویژگی ۹۶ درصد برای تست agar screen نسبت به PCR به دست آمد، شاید به توان ادعا کرد که با توجه به سادگی و هزینه پائین روش مزبور، برای غربال‌گری کلنی‌هائی که در محیط‌های روزمره جدا شده‌اند و هم‌چنین برای تائید سویه‌های مقاوم مشکوک که در تست‌های دیسک دیفیوژن دیده می‌شوند، روش مناسبی باشد.

نتیجه گیری

روش agar screen (۶ میکروگرم در میلی لیتر) oxacillin در مقایسه باduplex PCR ، روشی فنوتیپی ساده، کم هزینه و کاربردی است که با داشتن جواب‌های مثبت کاذب نسبتاً پائین، برای تائید سویه‌های مشکوک مقاوم به متی سیلین مناسب است ولیکن با جواب‌های منفی کاذب نسبتاً بالا، مناسب غربال‌گری اولیه سویه‌های MRSA از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان‌ها نمی‌باشد. گرچه محیط مولر- هینتون آگار حاوی ۶ میکرو گرم در میلی لیتر اگزاسیلین که در این تحقیق به کار رفت، پیشنهاد NCCLS بود، ولیکن به نظر می‌رسد مقادیر کمتر

اگزاسیلین می‌تواند باعث افزایش حساسیت تست برای نمونه بینی از ناقلین سالم شود.

منابع

1. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Partcipants Group. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Cli Infect Dis 2001; 32(supll 2): s114-s132.
2. 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.
3. Mirsalehian A, Jebel Ameli F, Kazemi B, Ali-zadeh SA. Comparing disc diffusion and PCR in recognizing methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Tehran University Medical Journal 2003;61(6):420-425.
4. Nation Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 to June 2002. Am J Infect Control 2002; 30: 458-74.
5. Deresinski S. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Cli Infect Dis 2005;40(15):562-73.
6. Kim HB, Jang HC, Nam HJ, Lee YS, Kim BS, Park WB, et al. In Vitro activities of 28 antimicrobial agents against Staphylococcus aureus isolates from Tertiary-Care Hospital in Korea: a nationwide survey. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(4): 1124-7.
7 Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strässle A, Kayser FH. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in Staphylococcus aureus: molecular cloning and characterization. Mol Gen Genet 1989;219(1-2):263-9.
8. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. Correlation between regulation of mecA transcription and expression of methicillin resistance in Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1992;36(1):25-31.
9. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the mecA gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(4): 600-604.
10. Brown DFJ, 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.
11. Wallet F, Roussel-Devallez M, Courcol RJ. Choice of a routine method for detecting methicillin-resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother 1996;37(5):901-9.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. 5th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards;2000.
13. Nikbakht M, Nahai MR, Akhi MT, Asghar-zadeh M, Nikvash S. [Comparing different methods of disc diffusion, Oxacillin agar and PCR in recognizing methicillin resistance in Staphylococcus aureus in Tabriz]. Proceedings of the 8th congress of microbiology, Iran. 2006 May 22-24; Isfahan, Iran.p.88.
14. Aligholi M, Iman Eini M, Bonakdar Hashemi F, Shahsavan Sh, Jebel Ameli F, Kazemi B. [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 May 22-24; Isfahan, Iran.p.91.
15. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin resistant Staphylococcus aureus: comparison of susceptibility test methods mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. Bratisl Lek Listy 2005; 106(4-5): 163-7.

Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord, 2007

Nafisi MR[1]*, Kalhor H[2], Zamanzad B[3], Karimi A[4], Farokhi E[5], Validi M[2]

Abstract

Introduction: Methicillin resistant staphylococcus aureus strains are the most important agents of nosocomial infections. The conventional antibiotic susceptibility methods such as disk diffusion are not suitable for detection of these strains due to their heteroresistancy. Therefore, in this study, agar screen and duplex-PCR were compared in determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord, 2007.

Materials and Methods: In this experimental study a total of 204 nasal swabs from personnel of Hajar hospital over a period of 6 months were collected. The specimens were cultured on mannitol salt agar for primary isolation and identification of Staphylococcus aureus strains and their susceptibility pattern to oxacillin was assessed using agar screen method. Finally**,** using duplex PCR, the isolates were tested for the presence of mecA gene. Results were compared and sensitivity and specificity of the method was determined.

Results: In this study, 23 of the 52 (44%) Staphylococcus aureus isolates were resistant to oxacillin using agar screen method. However, mecA gene was detected in 27 of the 52 strains (52%). Our results showed that the sensitivity and specificity of agar screen method in determination of MRSA strains were 81.5% and 96%, respectively comparing with PCR.

Conclusion: Oxacillin agar screen, comparing PCR, is an inexpensive, applied and phenotypical method with low false positive and suitable for screening of MRSA. However, due to its relatively high false negative results is not appropriate for screening of MRSA strains isolated from hospital-employed nasal carriers.

Key words: Nosocomial infection, methicillin resistance, gene, polymerase chain reaction, Staphylococcus aureus

*Corresponding author;
Email: mrnafisi@yahoo.com
Address: Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

1 - Assistant professor, PhD of microbiology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.
2 - Lecturer, MSc of microbiology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.
3 - Associate professor, microbiologist, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.
4 - Associate professor, PhD of virology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.
5 - Lecturer, MSc of biochemistry, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.