مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۳: از ٦١-٦٩
پاییز ۱۳۸۸

شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک، تعیین MIC و PCR برای ژن *mecA*

شهین نجارپیرایه[1*]، امیر عظیمیان[2]، محمّد مصطفایی[2]، سیدداور سیادت[3]

۱- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن، انسیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۲۵ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۸/۲۰

چکیده

هدف: استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های شدید در بیمارستان و جامعه است. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین این باکتری شیوع و مرگ و میر بالا دارند. بنابراین برای درمان آنتی‌بیوتیکی و کنترل پخش عفونت لازم است که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به‌سرعت و دقت شناسایی شوند. در این تحقیق مقاومت به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک، آگار دایلوشن و PCR برای ژن *mecA* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ۱۷٤ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی از سه بیمارستان آموزشی جدا شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک تعیین شد و حداقل غلظت مهارکنندگی اگزاسیلین با آگار دایلوشن و PCR برای ژن *mecA* با آغازگرهای اختصاصی انجام شد.

نتایج: فراوانی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با روش انتشار دیسک، آگار دایلوشن و PCR به‌ترتیب ۵۰ درصد، ٤٧/٧ درصد و ٤٨/٢ درصد مشاهده شد و سویه‌های *mec* مثبت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده بسیار مقاوم‌تر از سویه‌های *mec* منفی بودند. نتایج آگار دایلوشن، مقاومت سطح پایین به متی‌سیلین (حداقل غلظت مهارکنندگی کمتر از ٦٤ میلی‌گرم در لیتر) را نشان داد. پراکندگی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در سه بیمارستان مورد بررسی مشابه بود و اختلاف معنی‌دار بین حضور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های مختلف بالینی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: PCR بهترین روش برای شناسایی روتین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین است به‌طوری که می‌تواند ٢٤ ساعت قبل از سایر روش‌های معمول سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را شناسایی کند.

کلیدواژگان: استافیلوکوکوس اورئوس، متی‌سیلین، ژن *mecA*، PCR، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان است. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) تهدید جدی در عفونت‌های بیمارستانی به‌شمار می‌آیند و روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازند. بروز سویه‌های MRSA بلافاصله یک سال پس از معرفی متی‌سیلین در ۱۹٦۱ از بیمارستان‌های اروپایی گزارش شد

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱٥
Email: najarp_s@modares.ac.ir

[۱، ۲]. اکنون این سویه‌ها در تمام دنیا پخش شده‌اند. فراوانی سویه‌های MRSA در کشورهای آسیایی نظیر چین، کره و تایوان بیش از ۷۰ درصد، در امریکای شمالی بیش ۵۰ درصد، در اروپا ۲۰ درصد و در ایران حدود ۵۰ درصد است [۳- ۸].

متی‌سیلین، پنی‌سیلین نیمه‌مصنوعی و نسبت به آنزیم‌های پنی‌سیلیناز (Penicillinase) مقاوم است. مقاومت نسبت به متی‌سیلین در سویه‌های MRSA از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به‌نام PBP2a (Penicillin Binding Protein 2a) است که تمایل اتصالی بسیار ضعیف به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد [۹، ۱۰]. PBP2a با ژن *mecA* رمزگذاری می‌شود و با کاست بزرگ ژنی متحرک SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) منتقل و در کروموزوم سویه‌های مقاوم قرار دارد [۱۱].

طبق گزارش‌ها، بیمارانی که با MRSA عفونت پیدا می‌کنند نسبت به آن‌هایی که با MSSA (Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*) عفونی می‌شوند، مدت طولانی‌تری در بیمارستان بستری می‌شوند، بنابراین علاوه بر هزینه درمان بیشتر، پیشرفت عفونت به باکتریمی (Bacteremia) یا آندوکاردیت (Endocarditis) بیشتر اتفاق می‌افتد [۱۲]، عوارض عفونت نظیر نارسایی کلیوی نیز در بین بیماران عفونی با MRSA بیش از بیماران عفونی با MSSA است [۱۳] و حتی میزان مرگ و میر در بین بیماران MRSA به‌طور معنی‌داری بیش از بیماران MSSA است [۱٤]. تشخیص به‌موقع و جداسازی این بیماران می‌تواند از پخش سویه‌های MRSA در محیط بیمارستان و کادر پزشکی جلوگیری به‌عمل آورد. در این تحقیق فراوانی MRSAها با سه روش انتشار دیسک (Disk diffusion)، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) به روش آگار دایلوشن (Agar dilution) و PCR برای ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌ها

۱۷٤ استافیلوکوکوس اورئوس از سه بیمارستان آموزشی شهر تهران از نمونه‌های مختلف بالینی نظیر خون (٦۰ نمونه)، خلط (۱۰ نمونه)، اگزودای تراشه (۳٤ نمونه)، ادرار (۳۷ نمونه) و زخم (۳۳ نمونه) جدا شدند. برای تعیین هویت از روش‌های معمول (کوکسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت، رشد در مانیتول سالت آگار (Mannitol salt agar)، DNase مثبت) استفاده شد. تولید کواگولاز (Coagulase) نیز با استفاده از پلاسمای سیتراته خرگوش روی لام یا لوله تأیید شد. همه سویه‌ها شماره‌گذاری و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند.

۲-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمایش انتشار دیسک با استفاده از دیسک‌های (شرکت‌های مدیای هند و پادتن طب ایران) ریفامپسین (Rifampicin) (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (Oxacillin) (۱ میکروگرم)، ونکومایسین (Vancomycin) (۳۰ میکروگرم)، کوتری‌موکسازول (Cotrimoxazole) یا تری‌متوپریم (Trimetoprim) (۱/۲۵ میکروگرم) + سولفامتوکسازول (Sulfametoxazole) (۲۳/۷۵ میکروگرم)، جنتامایسین (Gentamycin) (۱۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (Tetraycline) (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (Erythromycin) (۱۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم) و دوکسی‌سیکلین (Doxycycline) (۳۰ میکروگرم) در محیط MHA (Muller-Hinton Agar) (دارای ٤ درصد NaCl) طبق توصیه CLSI (Clinical and laboratory standards Institute) انجام شد [۱۵]. استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل در این آزمایش استفاده شد.

۲-۳- تعیین MIC برای متی‌سیلین

روش آگار دایلوشن برای انجام MIC استفاده شد. محیط MHA (دارای ٤ درصد NaCl) حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین (Sigma) تهیه شد. از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط TSA (Trypticase Soy Agar) سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند تهیه گردید و در غلظت نهایی 10^4 CFU در هر قطره در محیط MHA (Merck) دارای اگزاسیلین کشت داده شد و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت [۱۵]. استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 به‌عنوان کنترل در این آزمایش استفاده شد.

۲-٤- استخراج DNA از باکتری‌ها

۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌های مورد آزمایش در محیط TSB (Trypticase Soy Broth) در ۱۲۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه به رسوب بافر TE (Tris EDTA) (۱۰ میلی‌مول تریس، ۱ میلی‌مول EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) با pH برابر ۸) و ۲۰ واحد لیزواستافین (Lysostaphin) اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس DNA با روش مرسوم فنل-کلروفرم استخراج شد [۱٦].

۲-۵- PCR برای شناسایی ژن *mecA*

برای انجام PCR از آغازگرهای (Primers) معرفی شده برای ژن *mecA* استفاده شد [۱۷]. ترادف بازی این آغازگرها عبارتند از (mecF) 5'- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' و (mecR) 5'- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'. PCR با ۵۰ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول dNTP، ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر و یک میکرولیتر از نمونه DNA انجام شد. این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف) قرار گرفت و با برنامه واسرشتگی (Denaturation) اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه واسرشتگی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) به DNA هدف در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد. مرحله طویل شدن نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. DNA استافیلوکوکوس اورئوس MRSA400 (سویه *mec* مثبت تهیه شده از مرکز رفرانس بوعلی) به‌عنوان شاهد مثبت برای انجام PCR استفاده شد.

۲-٦- شناسایی محصول PCR

ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) تهیه و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR نمونه‌های بالینی، کنترل مثبت (سویه رفرانس) و کنترل منفی (آب مقطر) درون چاهک‌های ژل قرار داده شد و الکتروفورز انجام شد.

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

پس از گردآوری داده‌ها با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری SPSS و Excel و با آزمون آماری کای- دو (x^2) به ازای P<۰/۰۵ تحلیل آماری صورت گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- آنتی‌بیوگرام

مقاومت ۱۷٤ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های مختلف نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول بررسی شد و نتایج آن در جدول ۱ آمده است. مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به پنی‌سیلین در همه استافیلوکوک‌های مورد بررسی مشاهده شد. سپس به‌ترتیب مقاومت به تتراسیکلین (٦۲ درصد)، اریترومایسین (۵۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۵۵/۷ درصد)،

جنتامایسین (۵۳/٤ درصد)، کوتری‌موکسازول (۵۲/۸ درصد)، اگزاسیلین (۵۰ درصد)، آمیکاسین (٤۳ درصد) و داکسی‌سیکلین (۳۸/۵ درصد) دیده شد. بیشترین مقاومت نسبت به اگزاسیلین در باکتری‌های جدا شده از اگزودای تراشه (۵۸/۸ درصد) و کمترین در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از خلط (۳۰ درصد) بود.

جدول ۱ مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده در آزمایش انتشار دیسک

نمونه دیسک	خون	زخم	ادرار	تراشه	خلط	تعداد کل
پنی‌سیلین	٦۰ (۱۰۰ درصد)	۳۳ (۱۰۰ درصد)	۳۷ (۱۰۰ درصد)	۳٤ (۱۰۰ درصد)	۱۰ (۱۰۰ درصد)	۱۷٤ (۱۰۰ درصد)
اگزاسیلین	۳۱ (۵۱/٦ درصد)	۱۳ (۳۹/۳ درصد)	۲۰ (۵٤ درصد)	۲۰ (۵۸/۸ درصد)	۳ (۳۰ درصد)	۸۷ (۵۰ درصد)
ونکومایسین	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سیپروفلوکساسین	۳٤ (۵٦/٦ درصد)	۲۳ (٦۹/٦ درصد)	۲۱ (۵٦/۷ درصد)	۱۳ (۳۸/۲ درصد)	٦ (٦۰ درصد)	۹۷ (۵۵/۷ درصد)
جنتامایسین	۳۳ (۵۵ درصد)	۱٦ (٤۸/٤ درصد)	۲۱ (۵٦/۷ درصد)	۱۸ (۵۲/۹ درصد)	۵ (۵۰ درصد)	۹۳ (۵۳/٤ درصد)
تتراسیکلین	۳۵ (۵۸/۳ درصد)	۲۵ (۷۵/۷ درصد)	۲۲ (۵۹/٤ درصد)	۱۹ (۵۵/۸ درصد)	۷ (۷۰ درصد)	۱۰۸ (٦۲ درصد)
داکسی‌سیکلین	۲۷ (٤۵ درصد)	۱۳ (۳۹/۳ درصد)	۱۵ (٤۰/۵ درصد)	۷ (۲۰/۵ درصد)	۵ (۵۰ درصد)	٦۷ (۳۸/۵ درصد)
اریترومایسین	۳۷ (٦۱/٦ درصد)	۲۰ (٦۰/٦ درصد)	۱۹ (۵۱/۳ درصد)	۱۹ (۵۵/۸ درصد)	٦ (٦۰ درصد)	۱۰۱ (۵۸ درصد)
کوتری‌موکسازول	۳۲ (۵۳/۳ درصد)	۱۹ (۵۷/۵ درصد)	۲٤ (٦٤/۸ درصد)	۱۲ (۳۵/۲ درصد)	۵ (۵۰ درصد)	۹۲ (۵۲/۸ درصد)
آمیکاسین	۲۹ (٤۸/۳ درصد)	۱۳ (۳۹/۳ درصد)	۱۵ (٤۰/۵ درصد)	۱۳ (۳۸/۲ درصد)	۵ (۵۰ درصد)	۷۵ (٤۳/۱ درصد)

۳-۲- MIC برای اگزاسیلین

با توجه به این‌که ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند (جدول ۱). برای بررسی سطح مقاومت، MIC اگزاسیلین با روش آگار دایلوشن برای استافیلوکوکوس‌ها تعیین شد. اگر MIC برابر با ۲ یا کمتر از آن باشد، سویه حساس و برابر ٤ یا بیش از ٤ را مقاوم گزارش می‌نمایند [۱۵]. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، مقاومت نسبت به اگزاسیلین در سطح پایین (Low level) است و اکثر سویه‌های مقاوم (۸٤/۵ درصد)، MIC برابر یا کمتر از ۳۲ میلی‌گرم در لیتر دارند. تعداد سویه‌های حساس، ۹۰ (۵۲/۲ درصد) و سویه‌های مقاوم به اگزاسیلین، ۸۳ (٤۷/۷ درصد) است و باکتری‌های جدا شده از اگزودای تراشه مقاومت بالاتری را نسبت به اگزاسیلین نشان می‌دهند.

جدول ۲ MIC اگزاسیلین برای استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

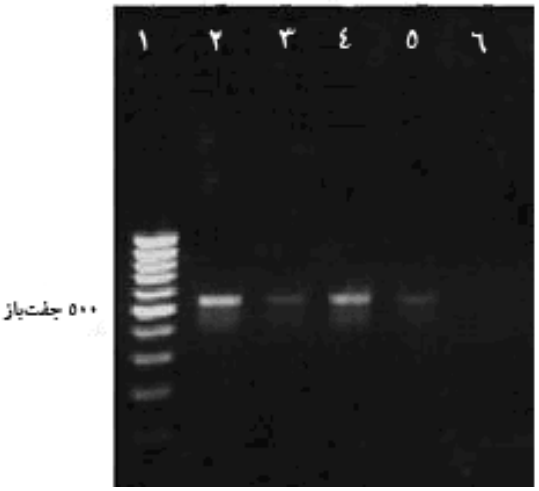
MIC (میلی‌گرم در لیتر) تعداد	٤<	۸ -٤	۳۲ -۱٦	>۳۲
خون	۳۰ (۵۰ درصد)	۹ (۱۵ درصد)	۱۷ (۲۸/۳ درصد)	٤ (٦/٦ درصد)
خلط	۷ (۷۰ درصد)	۱ (۱۰ درصد)	۱ (۱۰ درصد)	۱ (۱۰ درصد)
تراشه	۱٤ (٤۱/۱ درصد)	۵ (۱٤/۷ درصد)	۱۰ (۲۹/٤ درصد)	۵ (۱٤/۷ درصد)
ادرار	۲۰ (۵٤ درصد)	٦ (۱٦/۲ درصد)	۱۱ (۲۹/۷ درصد)	۰
زخم	۱۹ (۵۷/۵ درصد)	۵ (۱۵/۱ درصد)	٦ (۱۸/۱ درصد)	۳ (۹ درصد)
تعداد کل	۹۰ (۵۲/۲ درصد)	۲٦ (۱٤/۹ درصد)	٤۵ (۲۵/۸ درصد)	۱۳ (۷/٤ درصد)

جدول ۳ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های *mec* مثبت و *mec* منفی

آنتی‌بیوتیک / باکتری	سیپروفلوکساسین	جنتامایسین	تتراسیکلین	داکسی‌سیکلین	اریترومایسین	کوتری‌موکسازول	آمیکاسین
mec مثبت	۵۵ (۶۵/۴ درصد)	۵۵ (۶۵/۴ درصد)	۶۰ (۷۱/۴ درصد)	۳۸ (۴۵/۲ درصد)	۵۷ (۶۷/۸ درصد)	۶ (۶۶/۶ درصد)	۴۲ (۵۰ درصد)
mec منفی	۴۱ (۴۵/۵ درصد)	۳۸ (۴۲/۲ درصد)	۴۹ (۵۴/۴ درصد)	۳۱ (۳۴/۴ درصد)	۱۴ (۴۲/۴ درصد)	۳۶ (۴۰ درصد)	۳۳ (۳۶/۶ درصد)

۳-۳- PCR برای ژن *mecA*

مقاومت به متی‌سیلین با آغازگرهای اختصاصی ژن *mecA* بررسی شد. شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز برای محصول تکثیر شده با PCR را نشان می‌دهد. قطعه ژن تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی باند ۵۳۳ جفت‌باز است. از ۱۷۴ استافیلوکوکوس اورئوس، ۸۴ مورد (۴۸/۲ درصد) دارای ژن *mecA* بودند. فراوانی ژن *mecA* در باکتری‌های جدا شده از تراشه بیشتر از همه (۶۱/۷ درصد) و سپس به‌ترتیب خون (۵۰ درصد)، ادرار (۴۵/۹ درصد)، زخم (۳۹/۳ درصد) و خلط (۳۰ درصد) قرار داشتند.



شکل ۱ آنالیز الکتروفورتیک محصول PCR برای ژن *mecA*؛ **۱)** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی، **۲)** سویه مرجع (۵۳۳ جفت‌باز)، **۳، ۴، ۵)** نمونه‌های مثبت بالینی، **۶)** کنترل منفی (آب مقطر)

برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین سه روش مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج، با روش انتشار دیسک، ۵۰ درصد، PCR، ۴۸/۲ درصد و آگار دایلوشن، ۴۷/۷ درصد استافیلوکوکوس اورئوس‌ها مقاوم به متی‌سیلین بودند. تفاوت اندکی در نتایج سه روش مشاهده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P<0/05$).

سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس از نظر مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها با سویه‌های حساس به متی‌سیلین این باکتری مقایسه شدند. مطابق با جدول ۳ مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوکوس‌های *mec* مثبت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش (به استثنای کوتری‌موکسازول) بیش از باکتری‌های *mec* منفی بود.

۴- بحث

شناسایی و درمان سریع عفونت‌های ناشی از MRSA از اقدامات مهم در پیشگیری از گسترش عفونت و کاهش خطر مرگ و میر بیماران است. سویه‌های MRSA علاوه بر این‌که نسبت به متی‌سیلین و داروهای بتالاکتام مقاوم هستند، مقاومت بیشتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها هم نشان می‌دهند [۱۳، ۱۴، ۱۸- ۲۱]. در مطالعه حاضر نیز مقاومت سویه‌های MRSA نسبت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی بیش از سویه‌های MSSA بود. فتح‌الله‌زاده و همکاران هم سویه‌های MRSA را به سایر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار مقاوم گزارش کرده‌اند [۱۸]. خوشبختانه همه استافیلوکوکوس اورئوس‌های مورد بررسی در این تحقیق به ونکومایسین حساس بودند و این

آنتی‌بیوتیک هنوز کارایی لازم برای درمان عفونت‌های MRSA را در بیمارستان‌های مورد تحقیق دارد.

روش معمول آزمایشگاهی برای تشخیص MRSA انجام آنتی‌بیوگرام یا انتشار دیسک است که با دیسک‌های ۱ میکروگرمی اگزاسیلین همراه با سایر دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انجام می‌گیرد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که ۵۰ درصد سویه‌ها، MRSA هستند. در حالی‌که تعیین MIC با روش آگار دایلوشن، MRSAها را ٤٧/٧ درصد و با PCR، ٤٨/٢ درصد نشان داد. PCR روش استاندارد طلایی برای شناسایی MRSAها است [۲۰، ۲۱] و در اغلب مقالات برای ارزیابی سایر روش‌ها استفاده می‌شود. در حالی‌که روش انتشار دیسک، روشی است آسان و ارزان و به‌راحتی در همه آزمایشگاه‌ها قابل اجراست. انتشار دیسک با رعایت تمام دستورالعمل‌های CLSI و با استفاده از سویه کنترل استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 انجام شد. با این همه سه سویه با این آزمایش MRSA گزارش شد که نتیجه با PCR تأیید نشد. تکرار آزمایش انتشار دیسک نشان داد که هر سه سویه حساس به متی‌سیلین بودند. معمولاً انتشار دیسک نتایج منفی کاذب در آزمایش‌ها نشان می‌دهد و حساسیت آن را مخصوصاً نسبت به سویه‌هایی با مقاومت هتروژن پایین گزارش می‌کنند [۲۱، ۲۲]. نتایج این مقاله نشان می‌دهد که آزمایش انتشار دیسک یا آنتی‌بیوگرام که به‌طور گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیصی انجام می‌شود، می‌تواند نتایج مثبت کاذب هم در بر داشته باشد. مقدار باکتری تلقیحی، قطر محیط کشت و دیسک‌های مورد استفاده همه می‌توانند در نتایج این آزمایش تأثیرگذار باشند. آزمایش غربالگری در آگار و انتشار دیسک با دیسک‌های سفوکسیتین (Cefoxitin) و موکسالاکتام (Moxalactam) روش‌های جایگزینی هستند که در مقالات گزارش شده است [۱۹، ۲۱].

نتایج آگار دایلوشن در بررسی حاضر در مقایسه با نتایج PCR مشابه با گزارش‌های قبلی است [۲۱، ۲۳]. این آزمایش وقت‌گیر بوده و کمتر معمول است ولی اطلاعات مهمی را در مورد مقاومت نسبت به متی‌سیلین نشان می‌دهد. طبق جدول ۲ فقط ۱۵ درصد از سویه‌های MRSA دارای MIC بیش از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اگزاسیلین هستند و در نتیجه مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی در سطح پایین است. سویه‌های با مقاومت بالا، MIC بیش از ٢٥٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند [۲۳، ٢٤]. ۳۲ درصد از سویه‌های MRSA جدا شده از شهر شیراز با MIC بیش از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده‌اند که تقریباً دو برابر گزارش حاضر است [۲۳]. اختلاف معنی‌دار بین مقدار MIC (سطح بالا مقاومت) و نوع نمونه بالینی در این تحقیق مشاهده نشد (P<۰/۰۵).

در این مطالعه مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش PCR، ٤٨ درصد است. فراوانی MRSAها در گزارش رهبر [۸] از تهران، ۵۳ درصد، فتح‌اللهزاده [۱۸] از تهران، ٣٦ درصد و از بیمارستان نمازی شیراز، ٤٣ درصد است [۲۳]. در کشور ترکیه نیز MRSAها ۵۱ درصد گزارش شده است [٢٤]. مقاومت به متی‌سیلین در اروپا ۲۰ درصد [۲۵] ولی در امریکا بین ۲۳ تا ۵۵ درصد گزارش شده است [٢٦]. افزایش رو به رشد در روند پخش ژن *mecA* در بین سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی و حتی سویه‌های جدا شده از افراد ناقل مشاهده می‌شود [۱۹، ۲۷] و نیازمند اقدامات مؤثر پزشکی برای پیشگیری از پخش MRSAهاست.

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های MRSA در نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های مورد مطالعه، پراکندگی تقریباً یکسان (٤٧/٧ تا ۵۲ درصد) دارد که نشان‌دهنده پخش یکنواخت سویه‌های مقاوم در شهر تهران است. مطالعات اپیدمیولوژی با استفاده از روش‌های تایپینگ (Typing) مختلف نظیر پالس فیلد ژل الکتروفورز (Pulse field gel electrophoresis) لازم است تا کلون‌های مسئول را شناسایی کند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، PCR روش آسان، سریع و مطمئن برای تشخیص MRSAهاست. شناسایی MRSAها و جدا کردن بیماران عفونی شده با این سویه‌ها و درمان ناقلین در

محیط بیمارستان از اقدامات مؤثر برای پیشگیری از گسترش سویه‌های MRSA است. خوشبختانه مقاومت به ونکومایسین در MRSAهای جدا شده در این تحقیق مشاهده نمی‌شود ولی مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حدود ۵۰ درصد یا بیشتر است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری کارشناسان بخش میکروب‌شناسی بیمارستان‌های لقمان، شریعتی و بقیه‌الله (عج) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1: 124-5.

[2] Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. Br Med J 1963; 1: 308-11.

[3] Wang JT, Chen YC, Yang TL, Chang SC. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42(3): 199-203.

[4] Aires de Sousa M, Crisóstomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, de Lencastre H. Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant Staphylococcus aureus from patients in two hospitals in Taiwan and China. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 159-63.

[5] Kim HB, Park WB, Lee KD, Choi YJ, Park SW, Oh MD, Kim EC, Choe KW. Nationwide surveillance for Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Korea. J Clin Microbiol 2003; 41(6): 2279-81.

[6] Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis 2004; 10(9): 1627-34.

[7] National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through Jane 2004. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.

[8] 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.

[9] Sabath LD, Wallace SJ. The problems of drug-resistant pathogenic bacteria. Factors influencing methicillin resistance in Staphylo-cocci. Ann N Y Acad Sci 1971; 182: 258-66.

[10] Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 1984; 158(2): 513-6.

[11] Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(6):1449-58.

[12] Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, O'Donnell A, Wagener MM, Yu VL. A prospective multicenter study of Staphylococcus aureus

bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. Medicine (Baltimore) 2003; 82(5): 322-32.

[13] Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically Ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Arch Intern Med 2002; 162(19): 2229-35.

[14] Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Behnke M, Daschner F, Rüden H. Mortality risk factors with nosocomial Staphylococcus aureus infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). Infection 2005; 33(2):50-5.

[15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (2002), 16th International supplement. CLSI document M100-S12, vol.22.No.1.Pennsylvania, USA.

[16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 1.21-1.52, 2.60-2.80, 7.3-7.35, 9.14-9.22.

[17] Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(10): 2240-44.

[18] Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, Nouri K, Sedaghat H, Feizabadi MM. 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.

[19] Nikbalht M, Nahaei MR, Akhi MT, Asgharzadeh M, Nikvash SD. Nasal carriage rate of Staphylococcus aureus in hospital personnel and inpatient and antibiotic resistance pattern of isolated strains from nasal and clinical specimens in Tabriz. Med J Tabriz Univ Med Sci 2007; 29(2): 131-8.

[20] 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.

[21] Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2766-71.

[22] Kampf G, Adena S, Rüden H, Weist K. Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible Staphylococcus aureus from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. J Hosp infect 2003, 54(2): 124-9.

[23] Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasoli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. Iran Biomed J 2004, 8: 173-8.

[24] 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.

[25] 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.

[26] Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006, 2: 3-10.

[27] Lu PL, Chin LC, Peng CF, Chiang YH, Chen TP, Ma L, Siu LK. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage. J Clin Microbiol 2005, 43(1): 132-9.