SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

روش تحقیق کمی

Archive of SID

مقایسه سه روش شناسایی استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)

موج خالقی*[1] ، سعیده سعیدی[2]
[1]: دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
[2]: دانشگاه پیام نور زابل،دانشکده علوم ، گروه زیست شناسی
s.saeedi12@yahoo.com

چکیده- استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از مهم ترین عوامل عفونت های شدید در بیمارستان و جامعه در جهان شناخته شده است. در این تحقیق مقاومت به متی سیلین با سه روش، انتشار دیسک ، آگار دایلوشن و PCR برای ژن mecA بررسی گردید . ۱۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از ناحیه حلق و بینی از پرسنل بیمارستان زابل جدا شد. حساسیت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک نشان داد که ۱۰۰٪ سویه ها به اگزاسیلین مقاوم هستند در صورتیکه در روش آگار دایلوشن ۵۸/۸۲ درصد و PCR ۴۱/۱۷ درصد تعیین شد.

کلید واژه- استافیلوکوکوس آرئوس، MRSA، MIC، disk diffusion، PCR

۱

- مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس یکی از مقاوم ترین باکتری های بون اسپور است که نسبت به شرایط نامساعد محیط، مواد ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیک ها مقاومت پیدا کرده اند و مشخص گردیده که مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در این باکتری به سرعت اتفاق می افتد و افزایش مقاومت به استافیلوکوکوس آرئوس به انواع آنتی بیوتیک ها روز به روز در حال افزایش است. علی رغم کاربرد آنتی بیوتیک های قوی و بهبود شرایط بهداشت عمومی و کنترل عفونت های بیمارستانی هنوز هم استافیلوکوکوس آرئوس به عنوان یک پاتوژن مهم در انسان محسوب می شود (4). سویه های مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا شناخته شده اند(۵، ۴، ۲) . در این باکتری ها علاوه بر مقاومت نسبت به متی سیلین مقومت نسبت به گروه های دیگر آنتی بیوتیک به طور همزمان گزارش شده است (۳). در سال ۲۰۰۲ سویه های استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین از بیماران جداسازی شدند که نسبت به وانکومایسین مقاوم بودند که این مسئله یکی از نگرانی های مهم جهان پزشکی می باشد (۴،۵). چندین مکانیسم ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک در این باکتری شناخته شده است، تولید بتالاکتاماز باعث ایجاد مقاومت نسبت به بسیاری از پنی سیلین ها می باشد. مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های گروه متی سیلین به دلیل کمبود یا عدم دسترسی به پروتئین های اتصالی به پنی سیلین (PBP) در ارگانیسم است که توسط ژن mecA برروی کروموزم ایجاد می گردد (۷، ۶، ۳، ۱).

با توجه به این مسئله که افراد ناقل این باکتری به عنوان منبع مهمی برای ایجاد بیماری در افراد سالم محسوب می شوند ، بنابراین شناسایی و جداسازی باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار است . لذا در این تحقیق بر آن شدیم که با مقایسه سه روش انتشار دیسک (Disk diffusion) ، تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی MIC(Minimum inhibitory concentration) به روش آگار دایلوشن (Agar dilution) و شناسایی ژن mecA از طریق PCR ، استافیلوکوک های آرئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) را شناسایی و جداسازی نماییم.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیری و جمع آوری نمونه

نمونه گیری از ناحیه بینی و حلق ۸۰ نفر کارکنان بیمارستان و گروه شاهد که در ارتباط با بیمارستان نبودند، توسط سوآب

www.SID.ir

Archive of SID

استریل مرطوب صورت گرفت. نمونه ها بلافاصله (حداکثر ۲ ساعت پس از نمونه گیری) به آزمایشگاه منتقل شده و برروی محیط کشت خوندتر و مانیتول سالت آگار کشت شده و استافیلوکوکهای آرئوس پس از ۲۴ ساعت توسط رنگ آمیزی گرم، کاتالاز و کواگولاز شناسایی شدند. سپس تمامی سویه ها شماره گذاری و در ۲۰- درجه سانتی گراد برای انجام آزمایش های بعدی نگهداری شدند .

۲-۲- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

آزمایش انتشار دیسک با استفاده از دیسک کلوگزاسیلین (Cloxacillin 1mcg) (ساخت شرکت پادتن طب ایران) در محیط MHA(Muller-Hinton Agar) انجام شد .

۲-۳- تعیین MIC برای کلوگزاسیلین

روش آگار دایلوشن برای انجام MIC استفاده شد . محیط MHA حاوی غلظت های متوالی(۱۶ppm-۱) از کلوگزاسیلین(ویال ۵۰۰mg ساخت شرکت فارابی ایران) تهیه شد .

۲-۴- استخراج DNA از باکتری

۱/۵ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری های مورد آزمایش در محیط NA(Nutrient Agar) در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد . آنگاه به رسوب بافر TE(Tris EDTA) (۱۰ میلی مول تریس ، ۱ میلی مول EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) با pH برابر ۸) اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت . سپس DNAبا روش فنل - کلروفرم استخراج شد.

۲-۵- PCRبرای شناسایی ژن mecA

برای انجام PCRاز آغازگرهای (primers) معرفی شده برای ژن mecA استفاده شد.

F:5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' ;R: 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-(3')

واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل lit L ،۱ μL primer F,R ، ۱۵mM Mgcl2 ، ۲μ dNTP ،۱ μ DNA ،۰/۳۵Taq polymerase بود .

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و Excel صورت گرفت .

۳- نتایج

از ۸۰ نمونه مورد آزمون، ۱۷ استافیلوکوک آرئوس جداسازی گردید.

مقاومت ۱۷ استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از حلق و بینی نسبت به آنتی بیوتیک کلوگزاسیلین بررسی شد ، مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به کلوگزاسیلین در همه استافیلوکوک های مورد بررسی مشاهده شد.

با توجه به این که ۱۰۰ درصد سویه ها نسبت به دیسک کلوگزاسیلین مقاومت نشان دادند. در تعیین کمترین غلظت مهار کننده کلوگزاسیلین (MIC) با روش آگار دایلوشن، ۵۸/۸۲ درصد استافیلوکوکهای آرئوس مقاوم بودند. بر طبق CLSI سویه های مقاوم به بیش از ۴mg کلوگزاسیلین، مقاوم و سویه های مقاوم به ۲mg ، نیمه حساس و کمتر از آن ، حساس گزارش می شوند(۸).

در مطالعه سویه های مقاوم به متی سیلین با روش PCR ، از ۱۷ استافیلوکوکوس آرئوس جداسازی شده ، ۷ مورد (۴۱/۱۷٪) دارای ژن mecA بودند

طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق مشخص گردید که اختلاف بین روش انتشار دیسک و تعیین کمترین غلظت مهار کننده (MIC) و جستجوی ژن mecA (PCR) از لحاظ آماری معنی دار است ($P< 0.0001$) ولی اختلاف معنی داری بین داده های حاصل از روش MIC و PCR مشاهده نگردید.

۴- نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق چنین استنباط می شود با آنکه متداول ترین روش آزمایشگاهی برای تشخیص MRSA انجام آنتی بیوگرام یا انتشار دیسک است، ولی روش های تعیین کمترین غلظت مهار کننده (MIC) و جستجوی ژن mecA (PCR) دقیق تر و حسا س تر می باشد. با توجه به مشخص گردید که روش انتشار دیسک از دقت و حساسیت کمی برخوردار است و احتمال جداسازی سویه های حساس بعنوان مقاوم (مثبت کاذب) می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

۵- منابع

[۱] **Felten A, Grandy B, Lagrange PH, Casin I**. 2002. 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 MRSAscreen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 40: 2766- 71.

[2] **Johnson AP, Pearson A, Duckworth G**. 2005. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. J Antimicrob Chemother. 56:455–62.

[3] **McKinney TK, Sharma VK, Craig WA , Archer GL**. 2001. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in Staphylococcus aureus (mecA) is corepressed but not coinduced by cognate mecA and â-lactamase regulators. J Bacteriol. 183: 6862-8.

[4] **Muller AA, Mauny F, Bertin M, Cornette C, Lopez-Lozano JM, Viel JF, et al**. 2003. Relationship between spread of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and antimicrobial use in a French university hospital. Clin Infect Dis. 36: 971–8.

[5] **Sista RR, Oda G, Barr J**. 2004.Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in ICU patients. Anesthesiol Clin North Am. 22:405–35.

[6] **Swenson JM, Tenover FC**. 2005. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of mecA in Staphylococcus spp. J Clin Microbiol. 43: 3818-23.

[7] **Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Patel JB**. 2007. Detection of mecA-mediated resistance using cefoxitin disk diffusion (DD) in a collection of Staphylococcus aureus expressing borderline oxacillin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis. 58: 33-9.

8- 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.

Comparison of three methods for identification of methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Abstract:

Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* is a major cuse of hospital- and community- aquired infections worlwide.In this study, resistance to methicillin was investigated by three methods; disk diffusion method, agar dilution and PCR for mecA gene. 17 strains of Staphylococcus aureus was isolated from throat and nose of the hospital staffs in zabol. In disk diffusion method, Antibiotic resitance was 100% but it was 58.82% in agar dilution and 41.17% in PCR method.

Key words: staphylococcus aureus, MRSA, MIC, disk diffusion, PCR

www.SID.ir

SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

روش تحقیق کمی