Original Article

Comparison of Susceptibility Testing of E-test Strips with Cefoxitin and Oxacillin Disks in Identification of Methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus Strains

Mohammad Bokaeian[1,2], Hamed Tahmasebi[1], Shahram Shahrki Zahedani[1,2]*

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[2]*Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Hamed Tahmasebi, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Email: h.tahmasebi87@yahoo.com

Received: 19 Apr, 2016

Accepted: 31 May, 2016

Abstract

***Background and Objectives*:** Over the years, *Staphylococcus saprophyticus*, in addition to becoming a serious pathogen, has become resistant to a wide range of antibiotics. Offering an inexpensive, rapid, and available method for identification of resistant bacteria can prevent the spread of infections caused by these bacteria. The aim of this study was to compare susceptibility testing of E-test strips with cefoxitin and oxacillin disks in identification of methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* strains in clinical samples.

Methods: In this study, 590 isolates of *Staphylococcus saprophyticus* were isolated from different parts of treatment centers in Zahedan city. After confirmation of the genus of isolates, resistance to methicillin, was defined in 262 samples using cefoxitin 30 µg and oxacillin 1 µg antibiotic disks. To determine minimum inhibitory concentration, E-test strips and cefoxitin and oxacillin disks, were used. The *mecA* gene was identified by PCR and considered as gold standard.

Results: Sensitivity of the test performed for cefoxitin and oxacillin antibiotics in the disk diffusion method, was 89.09% and 68.81%, respectively, and in the minimum inhibitory concentration, was 98.18% and 97.27%, respectively. Out of 262 samples, 110 were identified to be resistant to methicillin based on PCR assay.

Conclusion: According to the findings of this study, oxacillin antibiotic disk showed acceptable sensitivity to determine methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* strains. Also, the methods based on the use of E-Test strips had the highest sensitivity and specificity.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*; Drug resistance; Cefoxitin; *mecA* gene.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره پنجم، مرداد ۹۶
صفحه ۱۱۶ الی ۱۲۶

مقاله پژوهشی
(Original Article)

مقایسه حساسیت‌سنجی نوارهای E-test با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین و اوگزاسیلین در تشخیص سویه‌های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین

محمد بکائیان[۲،۱]، حامد طهماسبی[۱*]، شهرام شهرکی زاهدانی[۲،۱]

چکیده

زمینه و هدف: باکتری *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* در طی سالها، علاوه بر اینکه به یک عامل بیماری‌زای جدی تبدیل شده، به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاومت پیدا کرده است. ارائه روشی ارزان، سریع و در دسترس در شناسایی باکتری‌های مقاوم می‌تواند از گسترش آلودگی‌های وابسته به این باکتری جلوگیری کند. این مطالعه با هدف مقایسه حساسیت‌سنجی نوارهای E-test با دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین و اوگزاسیلین در تشخیص سویه‌های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های بالینی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، ۵۹۰ ایزوله متفاوت از قسمت‌های مختلف مراکز درمانی شهر زاهدان جداسازی شد. بعد از اینکه ایزوله‌ها تأیید جنس شدند، در ۲۶۲ نمونه، مقاومت به متی‌سیلین به‌وسیله دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم و اوگزاسیلین ۱ میکروگرم مشخص گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهاری، از نوارهای E-test اوگزاسیلین و سفوکسیتین مطابق با آخرین استانداردهای CLSI استفاده شد. ژن *mecA* توسط PCR مورد شناسایی قرار گرفت و به‌عنوان گلداستاندارد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: حساسیت تست‌های انجام‌شده برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اوگزاسیلین در روش‌های دیسک انتشاری به ترتیب ۸۹/۰۹٪، ۶۸/۸۱٪ و در روش حداقل غلظت مهاری به ترتیب ۹۸/۱۸٪، ۹۷/۲۷ ٪ بود. از مجموع ۲۶۲ نمونه، ۱۱۰ نمونه با آزمون PCR مقاوم به متی‌سیلین شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد دیسک آنتی‌بیوتیکی اوگزاسیلین برای تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* دارای حساسیت قابل‌قبولی نیست. همچنین روش‌های مبتنی بر استفاده از نوارهای E-Test، دارای بیشترین میزان حساسیت و ویژگی می‌باشند.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*؛ سفوکسیتین؛ مقاومت دارویی؛ ژن *mecA*.

[۱]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[۲] مرکز بیماری‌های عفونی - گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
حامد طهماسبی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، زاهدان، ایران

آدرس پست الکترونیکی:
h.tahmasebi87@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahrki Zahedani Sh. Comparison of susceptibility testing of e-test strips with cefoxitin and oxacillin disks in identification of methicillin-resistant staphylococcus saprophyticus strains. Qom Univ Med Sci J 2017:11(5):116-126. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

مقدمه

استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، یکی از باکتری‌های کوآگولاز منفی بوده که می‌تواند باعث بروز عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه عفونت دستگاه ادراری در زنان شود. این باکتری اولین‌بار توسط Friedrich Julius Rosenbach در سال ۱۸۸۴ کشف شد و به‌دلیل تولید کلنی‌های سفید، *استافیلوکوک آلبوس (S. albus)* نام گرفت (۱). پی بردن به حضور گسترده این باکتری روی پوست انسان، باعث گردید تا نام *S. albus* به *S. saprophyticus* تغییر پیدا کند (۱). این کوکسی گرم مثبت، جزء فلور طبیعی بدن انسان بوده و به‌طور معمول باعث بروز بیماری در انسان نمی‌شود، اما در افراد دارای نقص سیستم ایمنی به شکل بیماری‌زا تبدیل شده و باعث بروز مشکلاتی مانند عفونت و سنگ‌های ادراری می‌شود (۲).

در گذشته برای درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری، از متی‌سیلین استفاده می‌شد (۳). گسترش این باکتری در مناطق مختلف و استفاده بی‌رویه از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی متفاوت، به‌خصوص بتالاکتام‌ها برای درمان بیماران مبتلا به این باکتری، زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاومی شده که یکی از این سویه‌ها، *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant Staphylococcus Saprophyticus, MRSS) می‌باشد (۴). MRSS، یکی از باکتری‌های بیمارستانی است که می‌تواند باعث بروز عفونت‌های خطرناکی در انسان شود (۵). پراکندگی این باکتری به‌گونه‌ایی است که در حیوانات و فرآورده‌های حیوانی نیز یافت می‌شود (۶). اولین ایزوله مربوط به MRSS در سال ۱۹۱۰ در کشور ژاپن شناسایی شد و بعد از آن در کانادا، آمریکا و برزیل مشاهده گردید (۷). عامل مقاومت در سویه‌های MRSS، ژن *mecA* می‌باشد که باعث بیان شدن پروتئین PBP2a در باکتری شده و مانع اتصال آنتی‌بیوتیک به باکتری و در نتیجه اثر آن را خنثی می‌کند (۸).

این ژن بر روی یک کاست متحرک ژنی به‌نام کاست کروموزومال استافیلوکوکی وابسته به SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome Mec) قرار گرفته که باعث بروز مقاومت در سطوح متفاوت می‌شود (۹). شناسایی سریع و دقیق این سویه، با توجه به بالا بودن شیوع آن در دنیا و حضور این باکتری در بیشتر عفونت‌های بیمارستانی، به‌خصوص عفونت‌های ادراری می‌تواند در برخی موارد حیاتی بسیار مهم باشد (۴). از این‌رو برای شناسایی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، روش‌های متفاوتی وجود دارد که هر کدام بنا به خصوصیات خود دارای ویژگی و حساسیت متفاوتی هستند (۱۱،۱۰).

روش‌های فنوتیپی مانند دیسک دیفیوژن دیسک‌های سفوکسیتین، اگزاسیلین و نوارهای E-test به‌عنوان روش‌های خط اول شناسایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). در کنار این روش‌ها، روش‌های مولکولی نیز وجود دارند که با آنها می‌توان حضور یا عدم حضور ژن *mecA* را مورد بررسی قرار داد (۱۲،۵). وجود SCCmec در باکتری‌های این گروه باعث می‌شود سویه‌ها علاوه بر مقاومت در برابر اوگزاسیلین و سفوکسیتین، در برابر طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند که این امر می‌تواند زمینه بروز سویه‌های مقاوم به چند دارو را نیز فراهم کند (۱۳،۷). همچنین مطالعه و معرفی روش‌های دقیق و مناسب می‌تواند در شناسایی سویه‌های دارای مقاومت، مؤثر باشد. در این مطالعه، به بررسی میزان حساسیت و ویژگی روش‌های فنوتیپی در کنار روش‌های مولکولار برای تشخیص سویه‌های MRSE پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، طی یک دوره ۹ ماهه، ۵۹۰ نمونه بالینی مختلف (شامل: زخم، خون، ادرار، کاتاتر، سواپ، ترشحات و سایر) از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان طی بازه زمانی اسفندماه سال ۱۳۹۳ تا آذرماه سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری براساس نمونه‌گیری آسان و دردسترس انجام گرفت و بستری بودن بیماران در بخش‌های مختلف که مشکوک به عفونت‌های باکتریایی بودند؛ مبنای ورود و خروج تعیین گردید. سپس نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به داخل میکروتیوب‌های حاوی محیط ترانسپورت BHI، تلقیح و برای انجام آزمایشهای تکمیلی و تشخیصی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل گردید. نمونه‌های به‌دست‌آمده بر روی محیط‌های EMB agar (Eosin Methylene Blue Agar)

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

و Blood agar به‌صورت خطی کشت داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، انجام و کوکسی‌های گرم مثبت جداسازی شدند. برای افتراق *استافیلوکوک‌ها* از *استرپتوکوک‌ها*، از تست کاتالاز استفاده گردید.

برای جداسازی استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها نیز آزمایش اکسیداسیون و احیا (Oxidation and Fermentation test) OF انجام گرفت (۸).

برای تفکیک *استافیلوکوک‌های* کوآگولاز مثبت از *استافیلوکوک‌های* کوآگولاز منفی، از تست کوآگولاز لوله‌ای استفاده شد. برای شناسایی و جداسازی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، علاوه بر استفاده از دیسک‌های نووبیوسین و نالیدیکسیک اسید (MAST انگلیس)؛ از تست‌های PYR، آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین، تولید اسید از قندهای مالتوز، ترهالوز، مانیتول، سوکروز و عدم تخمیر گلوکز در شرایط بی‌هوازی استفاده شد.

در روش دیسک انتشاری، ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید، سپس از این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. در ادامه، دیسک را با یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. طبق آخرین نسخه CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute)، با استفاده از دیسک‌های نووبیوسین، باسیتراسین و پلی‌میکسین B؛ *استافیلوکوک‌های اپیدرمیدیس* از ساپروفیتیکوس جدا شد. {درصورتی‌که قطر هاله ایجادشده نسبت به دیسک نووبیوسین بیشتر از ۱۶ میلی‌متر، نسبت به پلی‌میکسین B بیشتر از ۱۰ و نسبت به باسیتراسین بیشتر از ۹ باشد، به‌عنوان *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* در نظر گرفته می‌شود و در ایزوله‌هایی که قطر هاله نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق کمتر از این مقدار باشد، به‌عنوان *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* در نظر گرفته می‌شود (۹)}.

بعد از تهیه محلول ۰/۵ مک‌فارلند و کشت بر روی محیط مولر هیلتون آگار (با ضخامت ۵ میلی‌متر)؛ دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم و اوگزاسیلین ۱ میکروگرم را با یک پنس‌استریل برروی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ساعت انکوبه شدند. براساس جدیدترین معیار CLSI، قطر هاله‌های به‌دست‌آمده مورد بررسی قرار گرفت (۶،۱۰). در این مطالعه، از سویه *استافیلوکوک اورئوس* ATCC33591 به‌عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده شد (۷). برای تعیین حداقل غلظت مهاری سویه‌های MRSS، از روش E-test استفاده گردید. در این روش، یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند، تهیه و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگار (Merck) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد و در آخر، یک نوار E-test (HiMedia هند) بر روی این محیط قرار گرفت (شکل شماره ۱). براساس استاندارد CLSI در این زمینه، حداقل غلظت مهاری ≤۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر برای اوگزاسیلین و حداقل غلظت مهاری ≤۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر برای سفوکسیتین به‌عنوان مقاوم در نظر گرفته شد (۹،۱۴،۱۵). استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (ساخت سیناژن ایران) براساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. بعد از انجام مراحل چندگانه استخراج، DNA به‌دست‌آمده در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد برای انجام آزمون‌های مولکولی، ذخیره گردید.

برای شناسایی ژن *mecA* از پرایمری که در مطالعه دهقان و همکاران مورد استفاده قرار گرفته بود، استفاده شد (۱۱). توالی اولیگو نوکلئوتیدی پرایمر به‌صورت زیر می‌باشد:

CCTAGTAAAGCTCCGGAA
CTAGTCCATTCGGTCCA

اندازه محصول PCR، ۳۱۰bp بود. پرایمرها به‌صورت پودر لیوفیلیزه از شرکت پیشگام، خریداری و طبق دستورالعمل برگه همراه، غلظت آن به ۱۰۰ پیکومولار رسید و بعد از چند ساعت قرارگیری در دمای ۴+ درجه سانتیگراد، برای انجام PCR و رقت‌گیری نهایی، در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جهت انجام واکنش PCR:

از ۲۵ میکرولیتر محلول نهایی حاوی ۱ میکرولیتر DNA الگو، پرایمر ۱۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (Ampliqonآلمان) شامل:

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mM $Mgcl_2$, 0.2%Tween20

- 4/ MmdNTP 4
- 2/0 unit Ampliqon polymeras
- Insert red dye and stabilizer

استفاده شد.

همچنین برای رساندن حجم نهایی، از آب مقطر دیونیزه و از مخلوط PCR فاقد DNA الگو نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید (۱۰). سپس آزمون PCR برای ژن *mecA* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، طبق الگوی دمایی جدول زیر انجام گرفت.

جدول شماره ۱: تنظیمات دمایی و سیکل تکرار برای تکثیر ژن *mecA*

مراحل واکنش	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)	سیکل
شوک حرارتی اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
جدا شدن قطعات DNA	۹۴	۱۲۰	۳۰
جفت شدن پرایمرها	۵۵	۱۲۰	
طویل شدن پرایمرها	۷۲	۶۰	
طویل شدن نهایی	۷۲	٤۲۰	۱

۶ میکرولیتر از محلول PCR در ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز شد. هنگام تهیه ژل، به آن ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه گردید. نتیجه نهایی به‌وسیله دستگاه CCD (Gel Documentation System) (مدل CCD-Tab1 کیاژن ایران)، بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر Ferments 100bp (Thermo fisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده گردید. آزمون PCR به‌عنوان گلد استاندارد برای مقایسه با سایر نتایج مورد استفاده قرار گرفت (شکل شماره ۱).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند. برای به‌دست‌آوردن حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری منفی و مثبت روش‌های دیسک دیفیوژن سفوکسیتین و تعیین حداقل غلظت مهاری سفوکسیتین با استفاده از نوار E-test از فرمول‌های زیر استفاده شد:

حساسیت: TP/TP + FN × 100

ویژگی: TN/TN + FP × 100

ارزش اخباری مثبت: TP/TP + FP × 100

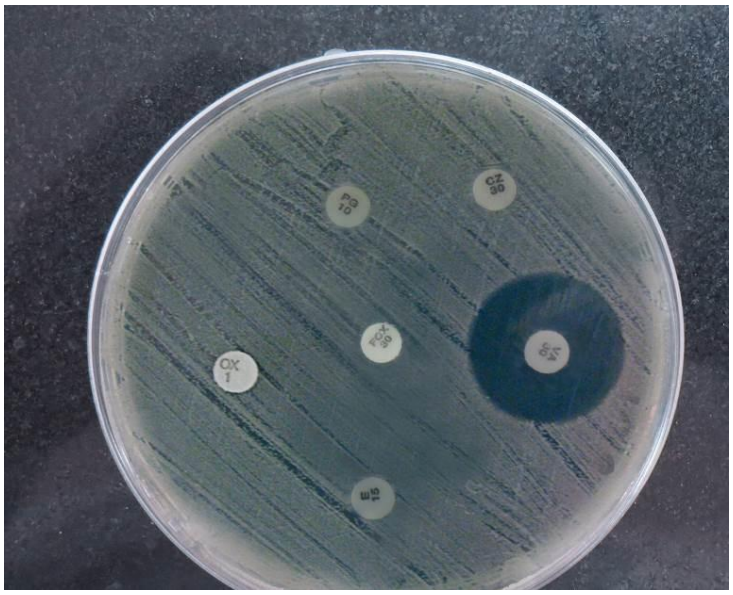
ارزش اخباری منفی: TN/TN + FN × 100

در این بررسی تست مولکولی PCR و ردیابی ژن *mecA* در سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سلین، به‌عنوان شاخص استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

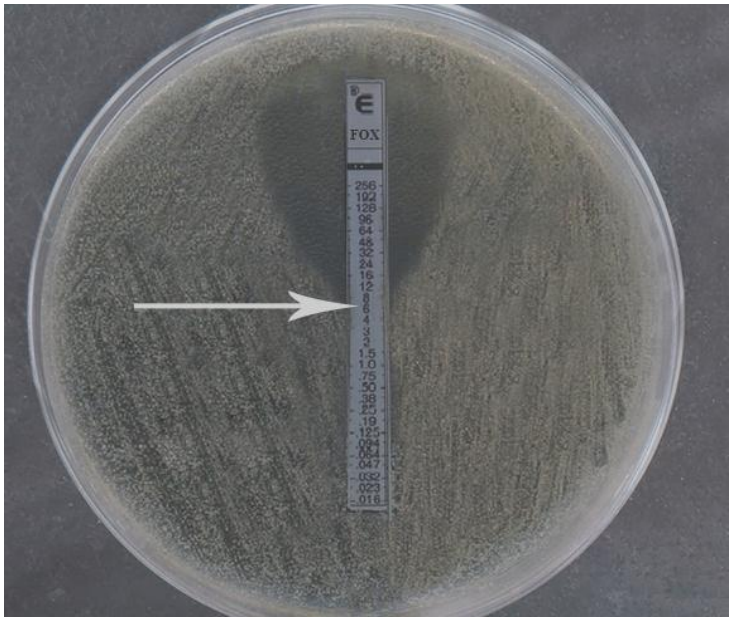
یافته‌ها

در این مطالعه، از مجموع ۲۶۲ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی مختلف (شامل زخم، خون، ادرار، کاتاتر و ...) بعد از تست‌های فنوتیپی اولیه، ۱۰۷ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* با روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین و ۱۱۴ ایزوله به روش دیسک دیفیوژن اوگزاسیلین به‌عنوان مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شدند. همچنین در روش تعیین حداقل غلظت مهاری؛ با استفاده از نوارهای E- test، ۱۰۹ ایزوله با نوارهای E. test سفوکسیتین و ۱۱۲ایزوله با استفاده از نوارهای E- test اوگزاسیلین به‌عنوان مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شدند. در این مطالعه حساسیت، ویژگی و گزارش اخباری مثبت و منفی آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اگزاسیلین با روش‌های حداقل غلظت مهاری با E-test و دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۲ و ۳). با توجه به در نظر گرفتن PCR به‌عنوان گلداستاندارد، از مجموع ۲۶۲ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، ۱۵۲ ایزوله دارای ژن *mecA* بودند و در نهایت با استفاده از آنالیزهای آماری، دیسک سفوکسیتین دارای بهترین عملکرد و حداقل غلظت‌های مهاری سفوکسیتین و اوگزاسیلین نیز از حساسیت خوبی برخوردار بودند (جدول شماره ۲).

با توجه به این نتایج، حساسیت و ویژگی تست‌های انجام‌شده برای آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اوگزاسیلین در روش‌های دیسک انتشاری و تعیین حداقل غلظت مهاری به ترتیب ۸۹/۰۹٪، ۶۸/۸۱٪، ۹۸/۱۸٪، ۹۷/۲۷٪، ۹۴/۰۷٪، ۷۴/۳۴٪، ۹۸/۰۲٪، ۹۸/۸۸٪ بود. در این بررسی، بعد از انجام آزمون PCR از مجموع ۲۶۲ نمونه، ۱۱۰نمونه حامل ژن *mecA* و ۱۵۲ نمونه فاقد این ژن بود (شکل شماره ۴).



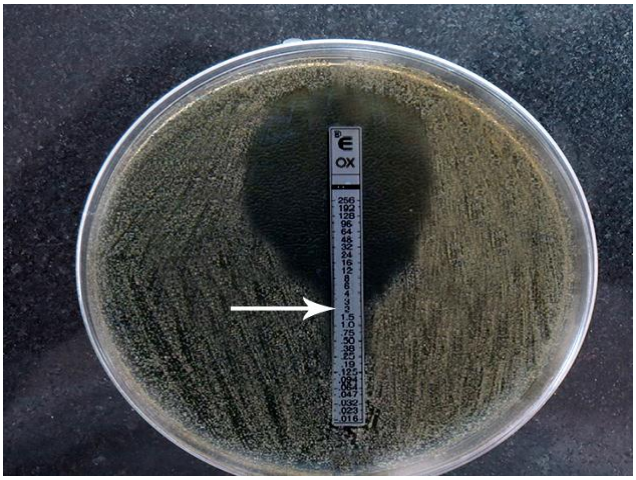
شکل شماره۱. غربالگری اولیه نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اوگزاسیلین (۱ میکروگرم).



شکل شماره۲: غربالگری اولیه نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین، به روش تعیین حداقل غلظت مهاری. توسط نوار E-test Cefoxitin. ناحیه مهاری ٤ میکروگرم برمیلی‌لیتر نشان داده شده است.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

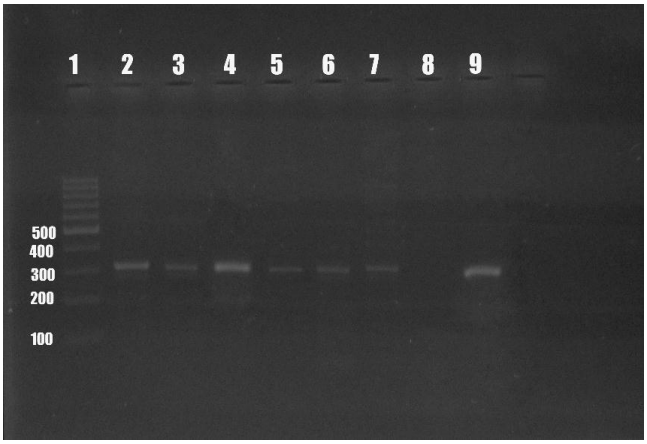
Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017



شکل شماره۳: غربالگری اولیه نمونه‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین، به روش تعیین حداقل غلظت مهاری. توسط نوار *E-test Oxacilin* ناحیه مهاری۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر نشان داده شده است.

جدول شماره۲: حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری منفی و مثبت تست‌های دیسک دیفیوژن و نوار E-test سفوکسیتین و اوگزاسیلین

تست	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)
دیسک سفوکسیتین Mast	۸۹/۰۹	۹٤/۰۷	۹۱/۵۸	۹۲/۸۵
دیسک اوگزاسیلین Mast	٦۸/۸۱	۷٤/۳٤	٦۵/۹۸	۷٦/۳۵
E-test اوگزاسیلین	۹۸/۱۸	۹۸/۰۲	۹۸/٦۸	۹۷/۲۹
E-test سفوکسیتین	۹۷/۲۷	۹۸/۸۸	۹۸/۰۳	۹۸/۱٦



شکل شماره٤ . نتایج تکثیر ژن *mecA* ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* روی ژل الکتروفورز ۱٪.
در چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp می‌باشد. چاهک‌های ۷ -۲ مربوط به نمونه‌هایی هستند که در ۳۱۰bp، باند تشکیل داده‌اند. چاهک شماره ۷ مربوط به نمونه کنترل منفی و
چاهک شماره ۹ مربوط به نمونه کنترل مثبت است.

جدول شماره۳: نتایج تعیین مقاومت به متی‌سیلین با روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*

آزمون تعیین حساسیت	ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* (n=۲٦۲)	
	حساس به متی‌سیلین	مقاوم به متی‌سیلین
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
سفوکسیتین	۱۵۳ (٪۵۸/۳۲)	۱۰۹ (٪۴۱/۶)
اوگزاسیلین	۱۵۰ (٪۵۷/۲۵)	۱۱۲ (٪۴۲/۷۸)
واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز (PCR)	۱۵۲ (٪۵۸/۰۱)	۱۱۰ (٪۴۱/۹۸)

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد روش‌های تعیین حداقل غلظت مهاری توسط E-test و روش دیسک انتشاری سفوکسیتین، بالاترین حساسیت و ویژگی را بین سایر موارد دارد. در این بررسی، در آزمون فنوتیپی به روش دیسک انتشاری، از دیسک‌های ایرانی پادتن طب (PT) در کنار دیسک‌های با برند مست انگلستان (Mast) و هایمدیا هند (Hi-Media) استفاده شد که نشان می‌داد دیسک‌های ایرانی دارای کمترین حساسیت و پایین‌ترین ارزش اخباری هستند. این امر در مقایسه با نوار E-test مورد استفاده بیشتر خود را نشان داد. در این روش‌ها، روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (دیسک‌های Mast) دارای حساسیت بسیار مناسبی نسبت به اوگزاسیلین برای کارهای فنوتیپی بود که می‌تواند جایگزینی مناسب و مقرون به‌صرفه برای روش مولکولی باشد (۱۲). البته نباید این امر را فراموش کرد که با افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، به‌خصوص سویه MRSS و افزایش شیوع مقاومت‌های چندداروویی در این باکتری و قرارگیری آن در زمره باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی، برای تشخیص سریع و جلوگیری از اپیدمی‌های وسیع، باید به روش‌های سریع و قابل‌اطمینان روی آورد (۸،۱۱،۱۳).

برای شناسایی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، در کوآگولاز منفی‌ها استفاده از دیسک سفوکسیتین نسبت به دیسک اوگزاسیلین دارای تقدم است (۱۳) نتایج حاصل در این مطالعه نیز مؤید این امر است که ارزش اخباری مثبت و منفی اوگزاسیلین نسبت به سفوکسیتین دارای جایگاه پایین‌تری می‌باشد، اما گاهی در کنار دیسک سفوکسیتین، دیسک اوگزاسیلین نیز استفاده می‌شود که در مطالعات مشابه بررسی شده است. شجاع و همکاران در مطالعه خود با بررسی روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی تشخیصی در تعیین باکتری‌های کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین نشان دادند دیسک اوگزاسیلین دارای کمترین حساسیت و ارزش اخباری می‌باشد، درحالی‌که تعیین حداقل غلظت مهاری برای اوگزاسیلین و سفوکسیتین، نتایج قابل‌قبولی را درپی داشت (۱۷،۱۴). بررسی‌های Monsen و همکاران (سال ۲۰۰۲) نیز نشان داد تعیین سویه‌های مقاوم در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* به روش‌های فنوتیپی در کنار روش‌های مولکولی نسبتاً قابل‌اعتماد است و حساسیت تست‌های دیسک سفوکسیتین و تعیین حداقل غلظت دیسک اوگزاسیلین و سفوکسیتین دارای بالاترین میزان حساسیت نسبت به سایر روش‌های فنوتیپی در مقایسه با روش PCR می‌باشد (۱۸). در مطالعات Antunes و همکاران (سال ۲۰۰۷) که از دیسک‌های سفوکسیتین و اوگزاسیلین به‌صورت همزمان برای تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استفاده شده بود، مشاهده گردید سفوکسیتین دارای گزارش اخباری بالاتری نسبت به اوگزاسیلین است. در این مطالعه نیز چند برند متفاوت از دیسک‌های سفوکسیتین و اگزاسیلین مورد بررسی قرار گرفت که مشخص گردید یکی از برندها دارای کیفیت مناسبی است (۱۹). در گزارشهای Secchi و همکاران (سال ۲۰۰۸) مشاهده گردید بهترین روش تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، آزمایشهای مولکولی می‌باشد. در این بین، تعیین حداقل غلظت مهاری اوگزاسیلین و استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین و اوگزاسیلین نیز برای تشخیص مفید بودند (۲۰). Febler و همکاران (سال ۲۰۱۰) با بررسی بهترین روش برای تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در عفونت‌های وابسته به کوآگولاز منفی‌ها نشان دادند برای مشخص‌کردن این سویه‌ها، به حداقل غلظت مهاری اوگزاسیلین در کنار آزمون‌های مولکولی بیشتر می‌توان اتکا کرد و برای گزارش نهایی از آن بهره برد (۲۱). استفاده از دیسک سفوکسیتین در مطالعات Join- Lambert و همکاران (سال ۲۰۰۶) نیز نشان‌دهنده این موضوع بود که این دیسک در بین سایر دیسک‌های تشخیصی در کنار PCR برای تشخیص سویه‌های مقاوم *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، دارای حساسیت و ویژگی مناسب‌تری است (۲۲). تعیین حداقل غلظت مهاری اوگزاسیلین در کنار استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اوگزاسیلین توسط Stierna-Johnsen و همکاران (سال ۲۰۰۵) نیز نشان داد بهترین روش برای تعیین MRSS با استفاده از آنتی‌بیوتیک اوگزاسیلین، استفاده از تعیین حداقل غلظت مهاری با E-test بوده و دیسک ارزش اخباری ندارد (۲۳). با توجه به این نتایج، باید این نکته را مدنظر داشت که همه دیسک‌های سفوکسیتین دارای ارزش تشخیصی مناسبی برای تعیین سویه‌های MRSS نیستند؛ به‌طوری‌که مطالعات

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

Skov و همکاران (سال ۲۰۰۵) نیز نشان داد استفاده از دیسک‌های سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی در مقایسه با دیسک‌های سفوکسیتین ۱۰ میکروگرمی و ۵ میکروگرمی، دارای ارزش تشخیصی بالاتری برای تعیین حضور ژن *mecA* و مشخص کردن سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین می‌باشند (۲۴). در مطالعات دیگر نیز این امر به‌وضوح دیده شده است (۲۵).

بنابراین، با توجه به مطالعات فوق و آخرین تغییرات مربوط به CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) که مؤید عدم کارایی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اوگزاسیلین در تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* می‌باشد، مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده عدم کارایی این دیسک بوده است (۲۶،۲۷). در گزارشهای Zhu و همکاران (سال ۲۰۰۶) که بر روی ارزش تشخیصی دیسک‌های سفوکسیتین و اوگزاسیلین برای تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین طبق استاندارد CLSI انجام شد، مشخص گردید دیسک سفوکسیتین دارای صحت اخباری بیشتری نسبت به اوگزاسیلین است (۲۷). با درنظرگرفتن مطالعات متعدد در زمینه ارائه بهترین روش فنوتیپی برای شناسایی سویه‌های MRSS، هنوز نمی‌توان این سویه‌ها را با قطعیت کامل گزارش کرد (۲۸). این در حالی است که PCR، با حساس‌ترین و معتبرترین آزمونی است که می‌تواند همولوگ‌هایی را که به‌صورت منفی کاذب و مثبت کاذب در گزارشهای فنوتیپی دیده می‌شوند مشخص کند (۲۹).

گرچه هزینه PCR نسبتا گران و دسترسی برای همه آزمایشگاه‌های بالینی به آن مقدور نیست، اما روش‌های فنوتیپی همیشه دارای ضریب خطای بالایی بوده و به‌طورکلی یا نمی‌توان همه شرایط لازم را فراهم کرد و یا فراهم‌کردن همه شرایط استاندارد برای به حداقل رساندن میزان خطای کاری، دشوار است (۱۹). به‌طور مثال، کنترل دائم دما، غلظت مواد مورد استفاده در ساخت محیط‌ها، مدت زمان انکوباسیون و آلودگی‌های معمول می‌توانند نتایج به‌دست‌آمده را تحت تأثیر قرار دهند. در میان روش‌های فنوتیپی، روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم در کنار روش E-test، دارای بالاترین اطمینان بود که با این تفاسیر یکی از جایگزین‌های مناسب برای روش‌های مولکولی تشخیصی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

افزایش سویه‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک در بین بیشتر باکتری‌های بیمارستانی، به‌خصوص *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، به یک امر نگران‌کننده مبدل شده است. تشخیص سریع و دقیق این سویه‌ها که بعضاً در عفونت‌های بالینی بیش از پیش پررنگ می‌شوند، علاوه بر اینکه می‌تواند در بهبودی بیمار کمک‌کننده باشد از بروز مقاومت‌های دیگر به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز جلوگیری می‌کند که این مهم با ارائه متدهای به‌روز و روش‌های دقیق برای شناسایی سویه‌های مقاوم میسر است.

References:

1. Licitra G. Etymologia: Staphylococcus. Emerg Infect Dis 2013;19(9):1553.

2. Martins A, Riboli DF, Camargo CH, Pereira VC, de Almeida Sampaio R, de Souza da Cunha Mde L. Antimicrobial resistance and persistence of Staphylococcus epidermidis clones in a Brazilian university hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;77(2):164-8.

3. Visciano P, Visciano P, Pomilio F, Tofalo R, Sacchini L, Saletti MA, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy cow farms. Food Control 2014;46(19):532-8.

4. Söderquist B, Berglund C. Methicillin-resistant Staphylococcus saprophyticus in Sweden carries various types of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). Clin Microbiol Infect 2009;15(12):1176-8.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017

5. Kitao T, Ishimaru M, Nishihara S. Detection of biofilm-producing and methicillin resistance genes in Staphylococcus epidermidis isolated from healthy humans and in blood culture tests. J Infect Chemother 2010;16(3):170-3.

6. Argudín MA, Vanderhaeghen W, Butaye P. Antimicrobial resistance and population structure of Staphylococcus epidermidis recovered from pig farms in Belgium. Vet J 2015;203(3):302-8.

7. Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Crombé F, Dispas M, Denis O, Hermans K, et al. Species and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) diversity among methicillin-resistant non-Staphylococcus aureus staphylococci isolated from pigs. Vet Microbiol 2012;158(1-2):123-8.

8. Chen CW, Hsu CY, Lai SM, Syu WJ, Wang TY, Lai PS, et al. Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms. Adv Drug Deliv Rev 2014;78:88-104.

9. Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard – eleventh edition. CLSI document M02-A11. Clin Lab Stand Inst 2012;32(2):1-88.

10. Rezaei M, Moniri R, Piroozmand A, Mousavi SGHA. Diagnostic value of cefoxitin susceptibility test compared with other diagnostic methods of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Feyz, J Kashan Univ Med Sci 2013;17(4):394-99. [Full Text in Persian]

11. Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The Presence of aac (6 ') Ie / aph (2 "), aph (3') - IIIa1, ant (4 ') - Ia1 genes and determining methicillin resistance in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus Saprophyticus strains isolated from clinical specimens. Arak Med Univ J 2017;19(11):11-25. [Full Text in Persian]

12. Koosha RZ, Fooladi AA, Hosseini HM, Aghdam EM. Prevalence of exfoliative toxin A and B genes in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. J Infect Public Health 2014;7(3):177-85.

13. Palazzo IC, Darini AL. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion. FEMS Microbiol Lett 2006;257(2):299-305.

14. Sharifi K, Yazdi M, Soltan Dallal MM. Prevalence study of enterococus and staphylococci resistance to vancomycin isolated from urinary tract infections. Tehran Univ Med J 2013 71(4):250-58. [Full Text in Persian]

15. Joseph F, John Jr, Ross J, Donald E. Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci. Infect Dis Antimicrob Agen 2015;15(9):130-50.

16. Oliveira AD, d'Azevedo PA, de Sousa LB, Viana-Niero C, Francisco W, Lottenberg C, et al. Laboratory detection methods for methicillin resistance in coagulase negative Staphylococcus isolated from ophthalmic infections. Arq Bras Oftalmol 2007;70(4):667-75.

17. Ahoja S, Nahai M, Niya S, Farajnia S, Ahangarzadeh Rezaee M, Nikvash S. Study of methicillin- resistance by oxacillin disc diffusion and PCR methods in Staphylococcus epidermidis isalates collected from blood cultures and their antibiotic susceptibility. J Med Sci Tabriz 2009;31(1):39-44. [Full Text in Persian]

18. Monsen T, Hadi A, Leonardsson K, Edebro H, Wistrom J. Prediction of mecA-positive coagulase-negative staphylococci: assessment of different phenotypic methods, breakpoints, culture media and culture conditions. J Antimicrob Chem 2002 49(1):197-200.

19. Antunes AL, Secchi C, Reiter KC, Rodrigues Perez L, Peixoto de Freitas RL, et al. Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative Staphylococci. Mem. Inst Oswaldo Cruz 2007;102(6):719-23.

20. Secchi C, Antunes AL, Perez LR, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. Identification and detection of methicillin resistance in Non-Epidermidis coagulase-negative staphylococci. Braz J Infect Dis 2008;12(4):316-20.

21. Fessler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J Antimicrob Chemother 2010;65(8):1576-82.

22. 1Join-Lambert OF, Clauser S, Guillet Ch, Jais JP, Abachin E, Quesnes G, et al. Comparison of cefoxitin and moxalactam 30 µg disc diffusion methods for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Antimicrobial Chem 2007;59(4):763-66.

23. Stierna-Johnsen TH, SchNheyder HC, Paulsen K. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by Cefoxitin disc diffusion and Oxacillin Etest. APMIS 2005;113(10):688-92.

24. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller B, Olsson-Liljequist, et al. Evaluation of a cefoxitin 30µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 2003;52(2):204-7.

25. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 12th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

26. Skov R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G, et al. Phenotypic detection of mecC-MRSA: Cefoxitin is more reliable than oxacillin. J Antimicrob Chemother 2014;69(1):133-5.

27. Zhu LX, Zhang ZW, Wang S, Yang HW, Zhang Q. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-µg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. Clin Microbiol Infect 2006;12(10):1039-42.

28. Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahraki Zahedani Sh, Adabi J. An investigation of toxic shock syndrome Toxin-1 Gene in methicillin-resistant clinical strains of Staphylococcus aureus using multiplex PCR method. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):57-67. [Full Text in Persian]

29. Luteijn JM, Hubben GA, Pechlivanoglou P, Bonten MJ, Postma MJ. Diagnostic accuracy of culture-based and PCR-based detection tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A meta-analysis. Clin Microbiol Infect 2011;17(2):146-54.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:57 IRDT on Wednesday August 23rd 2017