تاج الدین اکبرزاده خیاوی: کارشناس ارشد میکروب شناسی،شبکه بهداشت و درمان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
سیده نگار مدرس صدرانی: کارشناس ارشد بیوشیمی، اداره امور آزمایشگاههای مرکز بهداشت استان، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
عادل نصیری: کارشناس علوم آزمایشگاهی، شبکه بهداشت و درمان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

تشخیص آزمایشگاهی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

یک باکتری است که مایه‌ی چندین عفونت مقاوم به درمان در انسان می‌شود. این باکتری با روند انتخاب طبیعی به آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی، ازجمله پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مقاوم شده است. البته این مقاومت باعث نمی‌شود که ارگانیسم به طور ذاتی بیماری‌زاتر از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس فاقد مقاومت به آنتی‌بیوتیک باشد، بلکه درمان عفونت‌های ناشی از MRSA با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد را بسیار دشوار ساخته است، ازاین‌رو این باکتری‌ها بسیار خطرناک هستند. MRSA به‌طور ویژه‌ای در بیمارستان‌ها، زندان‌ها و خانه‌های سالمندان دردسرآفرین است و بیماران با زخم‌های باز، تحت اعمال تهاجمی و دارای سیستم ایمنی ضعیف نسبت به سایر مردم در معرض خطر بیشتری دارند.

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نخست در اوایل ۱۹۶۰ گزارش شد، و اکنون به‌عنوان پاتوژن عمده اکتسابی بیمارستانی در دنیا شناخته می‌شود. مقاومت زمانی رخ می‌دهد که ارگانیسم دارای ژن mecA، تولید پروتئین اتصالی به پنی‌سیلین تغییریافته، PBP2a و اکساسیلین با ۲mg/L MIC یا متی‌سیلین با 4mg/L MIC و یا هردوی آنها کند. بیماران عفونی و دارای کلون باکتری، مخزن MSRA هم در بیمارستان و هم در جامعه است. بیشتر آلودگی از راه تماس با کارکنان بهداشتی انجام می‌گیرد. تشخیص آزمایشگاهی و آزمون حساسیت به هنگام، در درمان، کنترل و پیشگیری از عفونت‌های MRSA بسیار مهم است.

روش های تشخیص آزمایشگاهی MRSA

آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی و آزمایشگاه‌های مرجع جهت برآورد شیوع MRSA کلیدی هستند. تکنیک‌های تازه ای برای شناسایی و تشخیص MRSA به کار می رود، رویهمرفته باکتری باید از خون، ادرار، خلط یا دیگر مایعات قابل‌کشت بدن جداسازی شود و به درستی کشت شوند. بهر روی روش سریع و آسان برای تشخیص عفونت MRSA وجود ندارد.

درمان اولیه اغلب بر پایه حدس قوی پزشک معالج است، ازاین‌رو هر درنگی در درمان این نوع عفونت می‌تواند نتایج مرگباری به همراه داشته باشد. تکنیک‌های تشخیصی پیشرفته شامل PCR کمی و کیفی هستند، که به‌طور روزافزون جهت تشخیص و شناسایی سویه‌های MRSA در آزمایشگاه‌های بالینی بکار گرفته می‌شوند. آزمون آزمایشگاهی معمول دیگر آزمون آگلوتیناسیون سریع لاتکس است،که پروتئین PBP2a را شناسایی می‌کند. PBP2a واریانتی از پروتئین اتصالی به پنی‌سیلین است که به استافیلوکوکوس اورئوس توانایی مقاومت به اکساسیلین را اعطا می‌کند.

استفاده از روش های کشت

غربالگری آزمایشگاهی MRSA، تعادل پیچیده بین سرعت نتایج، حساسیت، اختصاصیت و هزینه است. امروزه بیشتر روش‌های غربالگری برپایه استفاده از روش‌های کشت است. به علت وجود تعداد زیادی از ارگانیسم‌های "آلوده‌کننده" که از محل‌های غیراستریل در سواب‌ها ناشی می‌شوند، جداسازی از سواب‌های غربالگری می‌تواند یک روند طولانی باشد.

۱- کشت در محیط‌های غنی‌شده بر پایه براث

بیشتر برای افزایش حساسیت استفاده می‌شود، هرچند ایجاد نتایج سریع با آن‌ها هزینه‌بر است. بیشتر NaCl به همراه متی‌سیلین یا اکساسیلین و در سال‌های بسیار اخیر سفوکستین، به محیط‌های بر پایه براث اضافه می‌شود. از ترکیبات نشانگر نیز می‌توان جهت نشان دادن وجود MRSA استفاده کرد.

۲- کشت در محیط آگار جامد

روش استاندارد جهانی جهت غربالگری و جداسازی MRSA با استفاده از محیط آگار جامد وجود ندارد. محیط‌های انتخابی زیادی در دسترس هستند و متکی برمهارکننده‌هایی مانند NaCl و یا آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و به همراه نشانگر pH استفاده می‌شوند، برای نمونه، آگار نمک مانتیول حاوی ۷٪ NaCl به همراه mg/ ٤L متی‌سیلین یا ۲mg/L اکساسیلین، محیط برد پارکر به همراه

۸mg/L سیپروفلوکساسین، آگار مولرهینتون با ٤٪ NaCl و mg/ ٤L اکساسیلین هستند. حساسیت در ٢٤ ساعت تا ٤٨ ساعت انکوباسیون متفاوت بوده و اغلب برای حصول نتیجه قابل‌قبول موردنیاز است.

۳- محیط های رنگ‌زا

یک محیط رنگ‌زا اخیراً ساخته شده است که رشد اولیه و انتخاب را ترکیب کرده و MSRA را از استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی تشخیص می‌دهد. این محیط‌ها در مقایسه با محیط‌های سنتی ویژگی و حساسیت بهبودیافته‌ای را نشان می‌دهند، اما جهت حصول نتیجه ۸۵٪ < نیازمند ٤٨ ساعت انکوباسیون هستند.

تأیید مرسوم استافیلوکوکوس اورئوس

۱-تست کواگولاز

روش لوله ای

بلاسمای سیتراته خرکوش یاانسان رابه نسبت ۵:۱ رقیق کنید(۵ سرم و۱ بلاسما) سبس ۱./ میلی لیتر ازکشت جوان استافیلوکوکوس اورئوس رابه لوله محتوی ۵./ میلی لیتر بلاسمای رقیق شده اضافه نموده ومد ت ۱تا٤ساعت در کرمخانه ۳۷ درجه سانتیکراد قرار دهید درصورت کواگولاز مثبت بودن باکتری، بلاسمای موجود در لوله منعقد می شودوبه صورت لخته مشاهده می شود.

روش لام

دریک قطره سرم فیزیولوزی مقداری از کلنی استافیلوکوکوس اورئوس رابه صورت یکنواخت حل نموده سبس یک قطره بلاسمای رقیق شده به آن اضافه نمایید ومرتبا بهم بزنید اگر استاف کواگولاز مثبت باشد درعرض ۱۰ثانیه آگلوتیناسیون به صورت ذرات توده مانند در روی لام مشاهده می شود.

۲- تستDNase

استافیلوکوکوس اورئوس رابروی محیطDNase به صورت نقطه ای یاخطی کشت داده وبرای مدت ۱۸ تا٢٤ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید بعد برروی آان اسیدکلریدریک نرمال بریزید. درصورتیکه هاله شفاف اطراف کلنی مشاهده شد نشاندهنده حضور آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز درباکتری است.

۳- تخمیر مانیتول

استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مانیتول سالت آگار باتخمیر مانیتول ایجاد اسید می کند. مانیتول سالت آگار محیط انتخابی وافتراقی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. این محیط دارای ۷/۵ درصد نمک است ونیز دارای معرف فنل رد است که درصورت ایجاد اسید معرف ازرنگ صورتی مایل به قرمز به رنگ زرد تغییر رنگ پیدا می کند.

٤- حساسیت به نووبیوسین

استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نووبیوسین حساس است . باکتری را برروی محیط مغذی به صورت یکنواخت کشت داده بعد دیسک نووبیوسین(حاوی۵میکروکرم) رادرسطح محیط قرار داده وپلیت رادردمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت نکهداری کنید .ایجاد هاله عدم رشد دراطراف دیسک نشانه حساسیت به نووبیوسین است.

۵- تست فسفاتاز

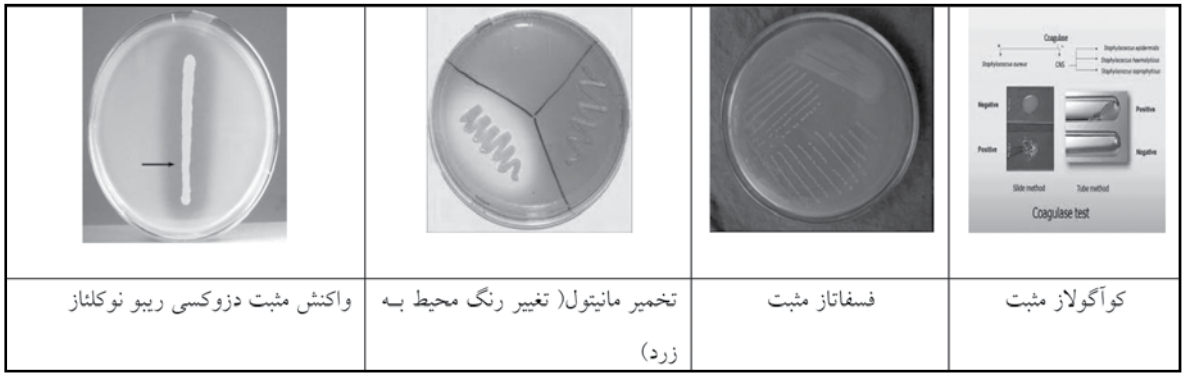
استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرممیدیس دارای آنزیم فسفاتاز می باشند. باکتری رادرمحیط فنل فتالئین فسفات آگارر کشت داده وبعد به مدت ۱۸ تا ٢٤ ساعت درحرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نکهداری نمایید. بعد ۱./ میلی لیتر امونیاک رادرداخل درب بتری ریخته وبلیت رابه مدت ۱ دقیقه یا بیشتر به طور وارونه قرار دهید . کلنیهایی که دارای آنزیم فسفاتاز هستند به رنک صورتی تغییر رنگ می یابند.

روش‌های مولکولی

روش‌های مولکولی که ژن mecA را بجای MIC شناسایی می‌کنند به‌عنوان روش مرجع می‌باشند. بیشتر روش‌های مولکولی مورداستفاده جهت تشخیص MRSA بر پایه پرایمرهای مولتی‌پلکس PCR استوار هستند، که ژن‌های خاصی از استافیلوکوکوس اورئوس (nuc,fem) و mecA مقاوم به متی‌سیلین را تشخیص می‌دهند. بسیاری از این‌ها تنها برای استفاده با کشت‌های خالص مناسب هستند، و به علت حضور استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی ناقل ژن مقاومت به متی‌سیلین mecA برای غربالگری سواب‌ها مناسب نیستند. آزمایش‌های تکثیری تجاری جدید ژن mecA را در ترکیب با مارکرهای دیگر مثل کوآگولاز مورد هدف قرار داده و نتایج دلگرم‌کننده‌ای را نشان داده‌اند

استفاده از روش بیولومینسانس

پیشرفت‌هایی با بیولومینسانس بخصوص در استفاده از آدنیلات کیناز (AK) وجود دارد، این آنزیم در همه سلول‌ها وجود داشته و تولید ATP از ADP می‌کند. اندازه‌گیری AK بسیار حساس‌تر از سیستم‌های بر پایه ATP است و امکان تشخیص معمول ۵۰



کوآگولاز مثبت	فسفاتاز مثبت	تخمیر مانیتول(تغییر رنگ محیط بـه زرد)	واکنش مثبت دزوکسی ریبو نوکلئاز

شکل۱- تایید مرسوم استافیلوکوکوس اورئوس

ارگانیسم یا بیشتر را در یک نمونه می‌دهد. داده‌های اولیه، کارایی و نتایج هم‌ارز با روش‌های کشت معمول را نشان دادند اما نتایج را در عرض ۵ ساعت ارائه می‌دهند.

تشخیص با استفاده از کیت‌های آگلوتیناسیون

این کیت ها به‌طور گسترده در دسترس هستند و می‌توان از آن‌ها جهت تأیید استافیلوکوکوس اورئوس با شناسایی پروتئین A و فاکتور تجمع استفاده کرد، با این وجود برخی سویه‌های MRSA مقدار کمی از این پروتئین‌ها را دارند. اکنون کیت‌های جدید نیز از طریق شناسایی آنتی‌ژن سطحی عمل می‌کنند. کیت‌های لاتکس دیگر، PBP۲a را شناسایی می‌کنند که در داخل غشای سلولی رخ می‌دهد و جهت شناسایی نیازمند لیز سلولی هستند.

کیت‌های بیوشیمیایی

طیف وسیعی از کیت‌های بیوشیمیایی تجاری دستی و خودکار در دسترس است که بر پایه آرایه آزمون بیوشیمیایی استوار است و پروفایل قابل ارزیابی با بانک اطلاعاتی یا جداول را ارائه می‌دهد. بسیاری از سیستم‌های خودکار جهت تأیید MRSA، تشخیص بیوشیمیایی استافیلوکوکوس اورئوس را با پانل حساسیت آنتی‌بیوتیک ترکیب می‌کنند.

روش‌های آزمون حساسیت به متی‌سیلین و اکساسیلین

این روشها گسترده هستند. روش منفردی وجود ندارد که مناسب برای تمام سویه‌های MRSA باشد. روش‌های استاندارد توسط شیمی‌درمانی ضدمیکروبی جامعه بریتانیا (BSAC) و در امریکا به‌وسیله مؤسسه استاندارد آزمایشگاه بالینی (CLSI)که قبلاً به‌عنوان NCCLS شناخته می‌شد منتشر شده است.

حداقل غلظت مهاری [MIC] به‌وسیله روش رقیق‌سازی، به‌طور سنتی روش مرجع است. BSAC پیشنهاد کرده است که از آگار مولر هینتون یا کلمبیا با ۲ NaCl و $۱۰^{٤}$ cfu/ml تلقیح‌شده و انکوبه شده در ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شود. CLSI، آگار مولر هینتون با ۲ NaCl و $۱۰^{٤}$ cfu/ml تلقیح‌شده و انکوبه شده در دمای ۳۵°C-۳۳ را توصیه کرده است.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش‌های انتشار دیسک

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش‌های انتشار دیسک، همچنان روشی با استفاده وسیع مانده است. اما نتایج متاثر از طیفی از فاکتورها شامل محیط، غلظت NaCl، دما، اینکولوم و ماده ی آزمون، قرار می‌گیرد. .در شماری از بررسی های تازه، با به کار بردن دیسک سفوکسیتین به جای اکساسیلین، اظهارخرسندی بیشتری دیده شده است. در ضمن محیط یا دمای انکوباسیون خاصی موردنیاز نیست و آزمون کمتر تحت‌تأثیر تولیدکننده بیشتر پنی‌سیلیناز قرار می‌گیرد.

منابع:

1.Batabyal Biswajit, K.R. Kundu Gautam, Biswas Shibendu: Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: A Brief Review. International Research Journal of Biological Sciences:1(7):2012.

2. Millar M.R., Walsh T.R. and Linton C.J., Carriage of antibiotic resistant bacteria by healthy children, J Antimicrob Chemother, 47, 605-610,2001.

3. Sanford M.D., Widmer A.F. and Bale M.J., Efficient detection and long term persistence of the carriage of MRSA, Clin Infect Dis., 19, 1123- 1125,1994.

4.. Mc Donald M., The epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: surgical relevance 20 years on, Aust N Z J Surg, 67, 682-685,1997.

5. Jensen S.O. and Lyon B.R., Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus, Future Microbiol, 4(5), 565–82,2009.

6. Lowy F.D., Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus, J. Clin. Invest., 111(9), 1265–1273,2003.

7. Pantosti A., Sanchini A. and Monaco M., Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus, Future Microbiol, 2(3), 323–334,2007.

8. Francois P.and Schrenzel J.,Rapid Diagnosis and Typing of Staphylococcus aureus, Staphylococcus: Molecular Genetics, Caister Academic Press, 2008.