©2016 ASP Ins., *Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran*
ISSN: 2252-0805 *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences 2016;22(3):201-207*

Comparison of Two PCR Methods in determining the Methicillin-Resistant Gene in Coagulase-Negative Staphylococci

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Bokaeian M.[1] *PhD,*
Tahmasebi H.* *MSc,*
Mohammadzadeh A.R.[2] *PhD,*
Adabi J.[1] *MSc,*
Sepehri Rad N.[3] *MSc*

How to cite this article
Bokaeian M, Tahmasebi H, Mohammadzadeh A.R, Adabi J, Sepehri Rad N. Comparison of Two PCR Methods in determining the Methicillin-Resistant Gene in Coagulase-Negative Staphylococci.Quarterly of the Horizon of Medical Sciences. 2016;22(3):201-207.

*Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
[1]Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
[2]Microbiology Department, Medicine School, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[3]Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Correspondence
Address: Microbiology Department, Medicine School, Zahedan University of Medical Sciences, Dr. Hesabi Square, Zahedan, Iran. Postal Code: 98167-43463
Phone: +985433295744
Fax: +985433425732
h.tahmasebi87@yahoo.com

Article History
Received: November 22, 2015
Accepted: April 16, 2016
ePublished: June 30, 2016

ABSTRACT

Aims It is very important to detect the coagulase-negative Staphylococci, which produce the hospital infections. Being one of the most expensive and time-consuming stages before the polymerase chain reaction (PCR), DNA extraction is one of the primary stages of PCR. Then, it should be noticed that the elimination of the stage might save time and costs. The aim of this study was to compare two PCR methods including the method with the utilization of the extracted DNA with the extraction kit and the direct PCR method in the detection of the methicillin-resistant genes in the coagulase-negative Staphylococci.

Materials & Methods In the descriptive cross-sectional study, 135 *Staphylococcus epidermidis* and 88 *Staphylococcus saprophyticus* samples were studied, separated from blood, wounds, urinary catheter, and urine samples of patients hospitalized in the treatment centers of Zahedan. The direct PCR was done on the *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* colonies. PCR with the extracted DNA was done for mecA and 16srDNA genes using the extraction kit, and the results were compared.

Findings In both methods, mecA and 16srDNA genes were successfully amplified in 310bp and 420bp related to Staphylococcus bacteria identifying gene and methicillin resistant gene, respectively. In addition, there were approximately the same band qualities.

Conclusion In order to save time and costs, the direct PCR method can be used to detect methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci.

Keywords *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus saprophyticus*; Drug Resistance Polymerase Chain Reaction

CITATION LINKS

[1] ContinEducAnaesthCrit Care ... [2] Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: Mortality and ... [3] Understanding the significance of Staphylococcus ... [4] Emergence of vancomycin resistance in ... [5] Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with ... [6] Coagulase-negativestaphylococci: Role as ... [7] Coagulase-negativestaphylococci: Pathogens associated with ... [8] Phenotypic and genotypic characterization of ... [9] Studying the presence of ... [10] Importance of coagulase-negative staphylococci as ... [11] Meticillin resistance in orthopaedic ... [12] -negative staphylococcal sepsis in ... [13] Distribution of staphylococcal cassette ... [14] Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary ... [15] Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to ... [16] Genomemaskerpackage for designing unique ... [17] PCR protocols: current methods and ... [18] Application of direct PCR in forensic ... [19] Selection of primers for polymerase chain ... [20] Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive ... [21] Genotyping of plant and animalsamples without ... [22] Practical disk diffusion method for detection of ... [23] Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of ... [24] Basic principles of ... [25] Genetic mechanisms of ... [26] Identification of methicillin-resistant Staphylococcus ... [27] First VRSA isolate identified in ... [28] Compare of two methods of direct PCR and ... [29] Rapid DNA extraction of bacterial genome of Staphylococcus aureus using ... [30] The histone core complex: An octamer assembled by ... [31] Direct PCR analysis for toxigenic ... [32] Development of a direct PCR assay for ... [33] Direct PCR detection of Escherichia coli ... [34] Use of PCR for direct detection of ... [35] Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison ... [36] Detection of noro viruses in ... [37] Evaluation of a direct PCR in comparison with routine ...

Copyright© 2016 ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

مقایسه دو روش PCR در تعیین ژن مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی

محمد بکائیان PhD
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
حامد طهماسبی* MSc
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
علیرضا محمدزاده PhD
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
جواد ادبی MSc
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
ناهید سپهری راد MSc
مرکز تحقیقات بیماری عفونی- گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

چکیده

اهداف: شناسایی استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی که مسئول ایجاد عفونت‌های بیمارستانی هستند، بسیار اهمیت دارد. یکی از مراحل اولیه PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)، استخراج DNA است که از وقت‌گیرترین و هزینه‌برترین مراحل قبل از PCR است و با حذف آن می‌توان در زمان و هزینه صرفه‌جویی کرد. هدف از این مطالعه، مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج و PCR مستقیم در تعیین ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۱۳۵ نمونه *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و ۸۸ نمونه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از نمونه‌های خون، زخم، سوند و کاتتر و ادرار بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان جداسازی شدند. PCR مستقیم از کلنی‌های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و PCR با DNA استخراج‌شده توسط کیت استخراج برای ژن‌های mecA و 16srDNA انجام شد و مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: در هر دو روش مورد استفاده ژن‌های 16srDNA و mecA با طول باندهای ۴۲۰ و ۳۱۰ جفت‌باز که به ترتیب مربوط به ژن شناسایی باکتری استافیلوکوک و ژن مقاومت به متی‌سیلین بودند، با موفقیت تکثیر شدند و کیفیت باندهای مشاهده‌شده تقریباً برابر بود.

نتیجه‌گیری: برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌توان از PCR مستقیم در تشخیص استافیلوکوک کوآگولازمنفی مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوک کوآگولازمنفی، مقاومت دارویی، واکنش زنجیره پلی‌مراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۸
*نویسنده مسئول: h.tahmasebi87@yahoo.com

مقدمه

پاتوژن‌های بیمارستانی، یکی از عوامل مهمی هستند که می‌توانند باعث اختلال در روند بهبودی بیماران بستری در بیمارستان شوند[1]. یکی از پاتوژن‌های بیمارستانی که اخیراً جایگاه ویژه‌ای در این گروه پیدا کرده است، استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی هستند[2]. این باکتری‌ها دارای خصوصیات متنوعی هستند که از این دست می‌توان به تمایل ارگانیزم به اتصال و کلونیزه‌شدن در وسایل مصنوعی اشاره کرد[3]. این باکتری‌ها که بعضی از آنها به‌صورت فلور نرمال روی پوست انسان زندگی می‌کنند، در صورت فراهم‌شدن شرایط، قادر به ایجاد بیماری هستند[4]. استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی مسئول بروز عفونت‌های گسترده‌ای در انسان بوده و می‌توانند سبب انتشار عفونت‌های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند[5].

از جمله مهم‌ترین استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی که می‌توان به آنها اشاره کرد، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس هستند[6]. این باکتری‌ها که سال‌ها به‌عنوان ساپروفیت محسوب می‌شدند، در دهه‌های اخیر به‌دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، نظیر سوندها، کاتترها و پروتزها به عوامل مهاجم و بیماری‌زا مبدل شده‌اند[7]. همین امر باعث شده است که این باکتری‌ها جزء باکتری‌هایی که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند، محسوب شوند[8]. این باکتری‌ها علاوه بر ایجاد عفونت‌های خونی شدید، می‌توانند باعث بروز عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های پوستی، اندوکاردیت و پنومونی شوند[9]. از این رو، درمان نامناسب عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی و گاهی استفاده نابجا یا بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف باعث بروز مقاومت‌های گسترده‌ای در این گروه شده است که می‌توان به مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری‌ها اشاره کرد[10]. مکانیزم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها مربوط به تولید پروتئینی به‌نام PBP_2 (پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین) است که میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها دارد و سبب مقاومت به داروهای بتالاکتام می‌شود[11]. PBP_4 و PBP_2A انواع دیگری از PBPها هستند که به‌دلیل اهمیت PBP_2 در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، این پروتئین بیشتر مورد بررسی قرار می‌گیرد[12]. تولید این پروتئین با ژن‌های mec موجود بر کروموزوم باکتری مرتبط است[13].

شناسایی این پاتوژن‌ها که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار اهمیت دارند، در بیشتر مواقع با روش‌هایی انجام می‌شود که دارای حساسیت و ویژگی مناسبی نیستند[14]. البته در تشخیص این

باکتری‌ها و بعضاً سویه‌های مقاوم، آزمون‌های دقیقی هم وجود دارند که با هدف قراردادن ژن‌های پاتوژنز یا عامل مقاومت، در کنار سرعت از دقت بالایی برخوردارند، اما به‌دلیل هزینه بالایی که دارند به‌صورت روتین قابل انجام نیستند[15]. PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های مولکولی است که می‌تواند برای ردیابی ژن‌های مختلف در مولکول DNA مورد استفاده قرار گیرد[16, 17]. PCR واکنشی است که توسط آن می‌توان به‌طور مصنوعی و در شرایط آزمایشگاهی ژن خاصی را در مولکول DNA تکثیر کرد[18]. سازوکار این واکنش به این صورت است که در ابتدا رشته‌های DNA الگو توسط حرارت در دمای ۹۵°C از هم جدا می‌شوند و بعد از آن با اتصال قطعات خاصی به‌نام پرایمر در دمایی خاص، همانندسازی انجام می‌شود[19]. در PCR مراحل سه‌گانه به‌صورت دناتوراسیون، اتصال و طویل‌سازی است که دما و مدت‌زمان هر مرحله و تعداد سیکل‌های تکرارشونده، با هم متفاوت است[5].

یکی مراحل PCR، آماده‌سازی و استخراج DNA است. این کار معمولاً با روش‌های جوشاندن، استفاده از فنل‌کلروفرم و کیت‌های استخراج انجام می‌شود و از طرفی PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده در برخی موارد علاوه بر تحمیل هزینه‌های مالی اضافه به محقق، سرعت کار را نیز کاهش می‌دهد[20]. با حذف مرحله استخراج DNA می‌توان سرعت انجام PCR را هنگام مطالعه روی تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها بالا برد[21]. در برخی باکتری‌ها از جمله استافیلوکوک‌ها می‌توان با استفاده از روش PCR مستقیم و برداشت از کلنی‌های باکتریایی، مرحله استخراج DNA را حذف کرد.

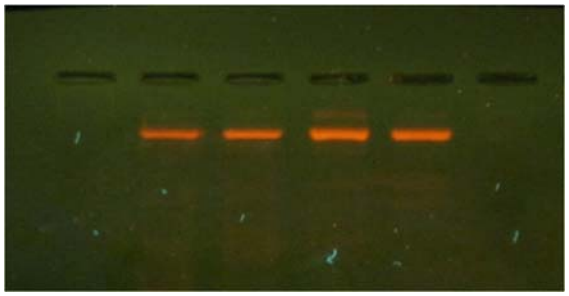
با توجه به اهمیت PCR برای تشخیص سریع و دقیق، هدف از این مطالعه مقایسه دو روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده با کیت استخراج و PCR مستقیم در تعیین ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی نمونه‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی که طی سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، از مجموع ۸۳۹ نمونه گرفته‌شده، ۱۳۵ نمونه *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و ۸۸ نمونه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از نمونه‌های خون، زخم، سوند و کاتتر و ادرار بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان جداسازی شدند. نمونه‌های به‌دست‌آمده توسط محیط BHI (مرک؛ آلمان) به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شدند. برای تعیین گونه‌های استافیلوکوک، نمونه‌ها روی محیط بلادآگار (مرک؛ آلمان) با ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و شناسایی گونه‌های استافیلوکوک کوآگولازمنفی با استفاده از روش‌های تشخیص میکروبی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، کوآگولاز، بررسی تولید DNase، کشت روی محیط مانیتول‌سالت‌آگار و بررسی حساسیت به نووبیوسین انجام گرفت. براساس CLSI (موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی)، با استفاده از دیسک‌های نووبیوسین ۳۰میکروگرم، باسیتراسین ۱۰میکروگرم و پلی‌میکسینB ۱۰۰واحدی سویه‌های *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* افتراق داده شدند. برای تشخیص *استافیلوکوک هومینیس* از *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* نیز از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دی‌سفریوکسامین استفاده شد و نمونه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک فسفومایسین دارای قطر هاله بیشتر از ۳۰میلی‌متر و برای دی‌سفریوکسامین دارای قطر هاله بیشتر از ۲۰میلی‌متر بودند، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* در نظر گرفته شدند. پس از جداسازی گونه‌های باکتری، نمونه‌ها در دمای ۲۰°C- تا زمان جداسازی DNA نگهداری شدند. از سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

استخراج DNA و کیفیت‌سنجی آنها: به‌منظور استخراج DNA در ابتدا ایزوله‌های ذخیره‌شده در ۲۰°C- روی محیط بلادآگار کشت داده شده و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت‌داده‌شده به ۵میلی‌لیتر محیط کشت لوریابرتانی‌براث تلقیح شد و به‌مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس لوله‌ها از انکوباتور خارج شده و ۱/۵میلی‌لیتر از محیط کشت درون میکروتیوب‌های ۱/۵میلی‌لیتری ریخته شد و مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج PR881614 (سیناژن؛ ایران) و طبق روش کار شرکت سازنده انجام شد.

برای بررسی کیفیت DNAهای استخراج‌شده، ابتدا با رقت‌سازی DNAهای استخراج‌شده، OD (دانسیته نوری) آنها مورد خوانش قرار گرفت و همچنین ۵میکرولیتر DNA روی ژل آگارز۱٪ الکتروفورز شد (شکل ۱). DNAهای حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰°C- ذخیره‌سازی شدند.



شکل ۱) کیفیت‌سنجی و تایید استخراج DNA باکتری‌های استافیلوکوک کوآگولازمنفی توسط کیت استخراج

در روش PCR مستقیم، به‌جای استخراج DNA و انجام مراحل چندگانه آن، از کلنی تازه باکتری به‌صورت کشت‌های ۲۴ساعته استفاده شد. تازه‌بودن کلنی‌ها و عدم نگهداری آنها برای انجام PCR را باید مورد نظر قرار داد.

انجام PCR با DNA استخراج‌شده و PCR مستقیم:

برای شناسایی ژن‌های mecA و 16srDNA از پرایمرهای این ژن‌ها استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱) پرایمرهای ژن‌های mecA و 16sDNA

پرایمرها	طول توالی	اندازه (جفت‌باز)
16SrDNA-F 16SrDNAR	CAGCTCGTGTCGTGAGATGT AATCATTTGTCCCACCTTCG	۴۲۰
mecA-F mecA-R	CCTAGTAAAGCTCCGGAA CTAGTCCATTCGGTCCA	۳۱۰

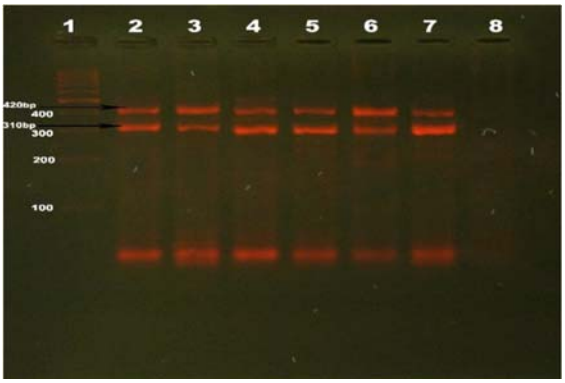
به‌منظور انجام واکنش PCR، حجم نهایی ۲۵میکرولیتر شامل؛ یک‌میکرولیتر از DNA الگو، یک‌میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰پیکومولار، ۱۲/۵میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon؛ آلمان) و ۱۰/۵میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد[14]. سپس واکنش PCR برای ژن mecA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad؛ ایالات متحده)، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۷°C به‌مدت ۲ دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲°C به‌مدت یک دقیقه انجام گرفت. برنامه PCR برای ژن 16srDNA مشابه ژن mecA انجام شد. محصولات PCR برای انجام الکتروفورز، در یخچال در دمای ۴°C+ نگهداری شدند.

برای انجام واکنش PCR مستقیم، به‌جای استفاده از DNA الگو و انجام مراحل مختلف استخراج، یک عدد از کلنی‌های باکتری تازه‌کشت‌داده‌شده با فیلدوپلاتین برداشته و داخل میکس آماده‌شده تلقیح شد. برای بهترحل‌شدن کلنی به‌مدت ۱۰ثانیه میکس نهایی ورتکس شد. برای آماده‌سازی میکس نهایی حجم نهایی مطابق با روش اول به ۲۵میکرولیتر رسانده و به‌جای یک‌میکرولیتر از هر پرایمر، ۳میکرولیتر از هر پرایمر اضافه شد و با همان سیکل دمایی واکنش انجام گرفت.

برای الکتروفورز محصول PCR، ۸میکرولیتر از آن در ژل آگارز۲٪ الکتروفورز شد و نتیجه نهایی توسط دستگاه مستندسازی ژل مدل CCD-Tab1 (کیاژن؛ ایران) بررسی شد.

یافته‌ها

در هر دو روش مورد استفاده ژن‌های 16srDNA و mecA با طول باندهای ۴۲۰ و ۳۱۰ جفت‌باز که به ترتیب مربوط به ژن شناسایی باکتری استافیلوکوک و ژن مقاومت به متی‌سیلین بودند، با موفقیت تکثیر شدند و کیفیت باندهای مشاهده‌شده تقریباً برابر بود (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲) الکتروفورز محصول PCR استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت (چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ تا ۷ نمونه‌های حاوی ژن 16sDNA با طول ۴۲۰bp و mecA با طول ۳۱۰bp، چاهک ۸ کنترل منفی)

از ۱۳۵ نمونه *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* ۱۱۹ مورد (۸۸/۱٪) با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط کیت استخراج و ۱۱۷ مورد (۸۶/۶٪) با استفاده از PCR مستقیم دارای ژن mecA بودند، و از ۸۸ نمونه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ۷۱ مورد (۸۰/۶٪) با روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده و ۶۸ مورد (۷۷/۲٪) با روش PCR مستقیم دارای ژن mecA بودند.

شکل ۳) الکتروفورز محصول PCR مستقیم استافیلوکوک‌های کوآگولازمنفی با استفاده از کلنی‌های مستقیم باکتری (چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ تا ۷ نمونه‌های حاوی ژن 16sDNA با طول ۴۲۰bp و mecA با طول ۳۱۰bp، چاهک ۸ کنترل منفی)

بحث

تشخیص باکتری‌های عامل بیماری و در کنار آن، مشخص‌کردن مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها، می‌تواند در امر درمان و کنترل مصرف دارو بسیار مهم باشد[22]. از این رو برای دست‌یافتن به یک تشخیص مطمئن و به‌صرفه، باید از روش‌های حساس استفاده کرد.

یکی از بهترین و سریع‌ترین روش‌های ممکن برای این کار، شناسایی ژن‌های کدکننده این عوامل است که با حساسیت بسیار بالا و میزان خطای اندک، تشخیص را قابل اطمینان می‌کند[23]. PCR می‌تواند ژن‌های مد نظر را مورد بررسی قرار داده و اطلاعات دقیقی از نظر مولکولی در اختیار محقق قرار دهد[24]. این روش در کنار داشتن حساسیت و ویژگی بسیار بالا نسبت به روش‌های قدیمی در شناسایی خصوصیات میکروارگانیزم‌ها، از سرعت خوبی هم برخوردار است[24]. بالابودن حساسیت این روش در تشخیص باکتری‌ها و عفونت‌های وابسته به باکتری‌های فرصت‌طلب مانند *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، که در برخی مواقع می‌توانند به‌واسطه وسایل پزشکی و آلودگی‌های سطوح بیماری‌های شدیدی را ایجاد کنند، نقش بسیار موثر و تعیین‌کننده‌ای دارد[25]. این در حالی است که با افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم استافیلوکوک کواگولازمنفی، خصوصاً سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، برای تشخیص سریع و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم باید به روش‌های سریع و قابل اطمینان روی آورد[25].

با استفاده از روش‌های فنوتیپی و سرولوژیکال نمی‌توان عوامل ایجادکننده عفونت‌های وابسته به استافیلوکوک‌های مقاوم را به‌سرعت تشخیص داد و عامل پاتوژن را از بین برد[26]. با مشخص‌کردن ویژگی‌های ذاتی یا اکتسابی باکتری بیماری‌زا، از جمله داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید توکسین‌های خطرناک، می‌توان در کمترین زمان ممکن با تجویز مناسب‌ترین دارو در مناسب‌ترین دوز ممکن، علاوه بر درمان به‌موقع و کم‌کردن خطر ناشی از عفونت، از بروز مقاومت‌های گسترده به‌دلیل تشخیص غلط و تجویز اشتباه نیز جلوگیری کرد[27].

اگر چه PCR یک روش ساده، آسان و دردسترس برای تکثیر ژنوم است، اما به استخراج DNA که یک مرحله وقت‌گیر است، نیاز دارد. برای رسیدن به بهترین نتایج در فرآیند PCR باید کیفیت DNA استخراجی را مد نظر قرار داد تا بهترین تکثیر را از قطعه مورد نظر داشته باشیم[28]. از این رو برای استخراج DNA روش‌های متفاوتی از جمله جوشاندن، فنل‌کلروفرم، رسوب با اتانول، استفاده از شوینده‌ها و استفاده از کیت‌های استخراج وجود دارد[29]. هر یک از این روش‌ها در کنار وقت‌گیربودن و تحمیل هزینه جانبی، دارای مشکلات و معایب زیادی نیز هستند[20]. روش فنل‌کلروفرم علاوه بر کُندبودن آن، به‌دلیل سمی و خطرناک‌بودن این ماده یک روش غیرایمن است و کارکردن با آن در طولانی‌مدت باعث بروز مشکلاتی می‌شود[30]. روش رسوب با اتانول هم می‌تواند با انتقال اتانول در مراحل نهایی باعث بروز خطا و حتی ازبین‌رفتن محصول نهایی شود که در نهایت کار را با خطا مواجه می‌کند[28]. روش جوشاندن نیز با داشتن شاخصه وقت‌گیربودن، کیفیت نسبتاً پایینی را از DNA استخراج‌شده عرضه می‌کند[25].

اما در کنار این موارد، برای تکثیر ژن‌های باکتریایی می‌توان بدون انجام استخراج DNA و با استفاده از کلنی‌های تازه‌کشت‌داده و تلقیح آنها در میکس نهایی، به نتایج قابل قبولی دست یافت. در این زمینه مطالعات متعددی انجام شده است که نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر یکسان است. *لیچتنستیگر* و همکاران با مطالعه روی باکتری *پاستورولا مولتی‌سیدا* با روش PCR مستقیم، نشان دادند که این روش برای شناسایی توکسین‌های این باکتری می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و در کنار داشتن ارزش تشخیصی مناسب، مشخص کردند که این روش در کنار روش‌هایی مانند الایزا و و تزریق یک دوز کشنده توکسین به موش، دارای سرعت، دقت و ارزش قابل قبولی است[31]. *ناکائو* و همکاران هم طی یک مطالعه روی توکسین‌های دیفتری با استفاده از PCR مستقیم، مشخص کردند که این روش دارای حساسیت قابل قبولی برای تشخیص سم دیفتری است و می‌توان توسط آن نمونه‌های بالینی را از نظر حضور ژن tox مورد ارزیابی قرار داد[32]. *فود واگان* و همکاران طی یک مطالعه از روش PCR مستقیم برای ارزیابی باکتری *اشریشیا کلی* استفاده کردند که نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان‌دهنده تطابق این روش با روش مبتنی بر استخراج DNA بوده و باندهای به‌دست‌آمده در هر دو روش تقریباً یکسان و قابل استناد هستند[33]. *اینگلیس* و همکاران با استفاده از PCR مستقیم ردیابی مولکولی گونه‌های کمپیلوباکتر را مورد بررسی قرار دادند[34]. *ون‌هال* و همکاران با مطالعه مولکولی روی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین، نشان دادند که روش PCR مستقیم می‌تواند یک روش مناسب در تشخیص این باکتری‌ها باشد، به‌طوری که حساسیت و ویژگی این روش در کنار کاهش قابل ملاحظه بار مالی، بیش از ۸۰٪ گزارش شد[35]. مطالعات مشابه انجام‌شده در ایران هم نشان‌دهنده این امر است که می‌توان با حذف مرحله استخراج و استفاده مستقیم از کلنی باکتری، با حفظ دقت، سرعت کار را بالا برد. در مطالعه *احسنی* و همکاران مشخص شد که می‌توان از روش PCR مستقیم برای مطالعه روی ژن‌های عامل توکسین در *کلستریدیوم دیفیسیل* استفاده کرد. این مطالعه نشان داد که کیفیت باندهای به‌دست‌آمده در این روش با کیفیت باندهای به‌دست‌آمده در روش PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده کاملاً برابرند[28].

سایر مطالعات نشان می‌دهند که روش PCR مستقیم علاوه بر اینکه در مطالعات باکتریایی قابل استفاده است، در مطالعات غیرباکتریایی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشد، به‌طوری که مطالعه *نیشیمورا* و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص کرد که RT-PCR (PCR با نسخه‌برداری معکوس) مستقیم از اختصاصیت و حساسیت مناسبی برای شناسایی نوروویروس‌ها برخوردار است و حتی می‌توان از این روش برای بررسی حضور نوروویروس در مدفوع نیز استفاده کرد[36]. علاوه بر پروکاریوت‌ها، PCR مستقیم در یوکاریوت‌ها هم مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه *فولادی* و همکاران، روش PCR مستقیم و سایر روش‌ها برای تشخیص لیشمانیوز جلدی مورد

مقایسه قرار گرفته است[37].

با توجه به مقطعی‌بودن این مطالعه و عدم وجود زمان کافی برای انجام آزمایشات تکمیلی، به نظر می‌رسد که با انجام مطالعات جامع‌تر می‌توان انجام PCR مستقیم را بهتر و بیشتر مورد آزمایش قرار داد. با ازبین‌بردن نتایج کاذب (مثبت و منفی) علاوه بر اینکه می‌توان این تست را به صورت پیش‌فرض و تاییدشده در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار داد، نتایج نیز در مقایسه با PCR معمولی قابل استناد خواهند بود. همچنین عدم انجام این آزمایش روی سایر گونه‌های باکتریایی یکی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه است که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده به این امر پرداخته شود.

براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت با توجه به وقت‌گیربودن مراحل استخراج DNA و پرهزینه‌بودن برخی کیت‌های استخراج DNA، استفاده از روش PCR مستقیم می‌تواند بسیار مفید باشد. علاوه بر این، در برخی روش‌های استخراج ممکن است برجای‌ماندن برخی مواد مورد استفاده در فرآیند استخراج، تاثیر بدی بر کیفیت و پایداری DNA بگذارد و نتایج بررسی را با خطا یا حتی با شکست مواجه کند. البته به‌دلیل عدم دردسترس‌بودن منابع کافی و نتایج مورد بررسی برای سایر باکتری‌ها از خانواده‌های مختلف خصوصاً باکتری‌های گرم‌منفی، نمی‌توان در گام اول این روش را برای استفاده گسترده پیشنهاد داد و توصیه می‌شود که این روش روی سایر باکتری‌ها از جنس‌های مختلف نیز انجام شود. اما با توجه به نتایج قابل قبولی که این روش نسبت به روش PCR با DNA استخراج‌شده داشت، توصیه می‌شود که در مواردی که قطعیت آنها اثبات شده است، از کلنی مستقیم برای انجام آزمایشات PCR استفاده شود.

نتیجه‌گیری

برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه می‌توان از PCR مستقیم در تشخیص استافیلوکوک کوآگولازمنفی مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولان مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی- گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و همچنین همکاران محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی زاهدان که در به‌ثمررسیدن این پژوهش یاریگر بودند، تشکر نمایند.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش در سال ۱۳۹۳ به تصویب کمیته اخلاق و پژوهش‌های علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان رسید.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان این پژوهش گزارش نشده است.

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و از محل اعتبارات طرح‌های تحقیقاتی صورت گرفت.

منابع

1- Inweregbu K, Dave J, Pittard A, Nosocomial infections. Contin Educ Anaesth Crit Care Pain. 2005;5(1):14-7.
2- Martin MA, Pfaller MA, Wenzel RP. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia: Mortality and hospital stay. Ann Intern Med. 1989;110(1):9-16.
3- Cheung GY, Otto M. Understanding the significance of Staphylococcus epidermidis bacteremia in babies and children. Curr Opin Infect Dis. 2010;23(3):208-16.
4- Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci.. N Engl J Med. 1987;316(5):927-31.
5- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994;19(2):231-43.
6- Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: Role as pathogens. Ann Rev Med. 1999;50(1):223-36.
7- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994;19(2):231-43.
8- Makki AR, Sharma S, Duggirala A, Prashanth K, Garg P, Das T. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative staphylococci (CoNS) other than Staphylococcus epidermidis isolated from ocular infections. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(12):9018-22.
9- Raei F, Eftekhar F. Studying the presence of blaZ gene and betalactamase production in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Iran J Med Microbiol. 2008;2(2):35-41.
10- Maskell R. Importance of coagulase-negative staphylococci as pathogens in the urinary tract. Lancet. 1974;1(7867):1155-8.
11- Uçkay I, Harbarth S, Ferry T, Lübbeke A, Emonet S, Hoffmeyer P, et al. Meticillin resistance in orthopaedic coagulase-negative staphylococcal infections. J Hosp Infect. 2011;79(3):248-53.
12- Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(9):817-22.
13- Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. J Med Microbiol. 2007;56(10):1328-33.
14- Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. Vet Microbiol. 2011;147(2):142-8.
15- Zadoks RN, Watts JL. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. Vet Microbiol. 2009;134(1-2):20-8.

16- Andreson R, Reppo E, Kaplinski L, Remm M. Genomemasker package for designing unique genomic PCR primers. Bio Med Clin Bioinform. 2006;7:172.
17- Walley AJ. PCR protocols: current methods and applications. J Med Genet. 1994;31(1):87.
18- Ottens R, Templeton J, Paradiso V, Taylor D, Abarno D, Linacre A. Application of direct PCR in forensic casework. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2013;4(1):e47-8.
19- Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. Methods Mol Biol. 1993;15:31-40.
20- Shahbazi B. Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. Zanko J Med Sci. 2014;15(45):9-16.
21- Chum PY, Haimes JD, André CP, Kuusisto PK, Kelley ML. Genotyping of plant and animal samples without prior DNA purification. J Vis Exp. 2012;10(67):3791-3844.
22- Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4740-4.
23- Capoluongo E, Giglio A A, Lavieri MM, Lesnoni-La Parola I, Ferraro C, Cristaudo A, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. J Dermatol Sci. 2001;26(2):145-55.
24- Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR. Mol Biotechnol. 2000;15(2):115-22.
25- Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: A review. Acta Oncol. 1991;30(1):87-105.
26- Montazeri EA, Khosravi AD, Jolodar A, Ghaderpanah M, Azarpira S. Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from burn patients by multiplex PCR. Burns. 2015;41(3):590-4.
27- Quirk M. First VRSA isolate identified in USA. Lancet Infect Dis. 2002;2(9):510.
28- Ahsani MR, Shamsaddini BM. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in Clostridium Perfringens typing. Iran Vet J. 2012;8(4):5-12.
29- Mousazade Moghadam M, Babavalian H, Mirnejad R , Shakeri F. Rapid DNA extraction of bacterial genome of Staphylococcus aureus using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using PCR. Med Lab J. 2012;6(1):35-42.
30- Eickbush TH, Moudrianakis EN. The histone core complex: An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. Biochem. 1978;17(23):4955-64.
31- Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic Pasteurella multocida. J Clin Microbiol. 1996;34(12):3035-9.
32- Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1651-5.
33- Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol. 2003;37:239-43.
34- Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of Campylobacter species in bovine feces. Appl Environ Microbiol. 2003;69(6):3435-47.
35- van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and chromagar MRSA) for use with infection-control swabs. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2486-90.
36- Nishimura N, Nakayamaa H, Yoshizumib S, Miyoshib M, Tonoikea H, Shirasakia Y, et al. Detection of noroviruses in fecalspecimens by direct RT-PCR without RNA purification. J Virol Methods. 2010;163(2):282-6.
37- Fazaeli A, Fuladi B, Hashemi Shahri M, Sharifi I. Evaluation of a direct PCR in comparison with routine microscopy and in vitro culture for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Iran J Public Health. 2007;36(Suppl 1):1-2.