مقاله پژوهشی

بررسی فنوتیپی و مولکولی مقاومت به بتالاکتام ها در استافیلوکوک های کواگولاز منفی مقاوم به متی سیلین

نویسندگان:

حامد طهماسبی [1*]، محمد بکائیان [2]، جواد ادبی [1]

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.1, Spring 2016

چکیده:

مقدمه: بروز مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام یکی از شایع‌ترین موارد مقاومت در استافیلوکوک ها است. این امر در پاتوژن های بیمارستانی از جمله استافیلوکوک های کواگولاز منفی به فراوانی دیده می‌شود. ازاین‌رو شناسایی عوامل مقاوم می‌تواند در امر درمان کمک‌کننده باشد. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت بتالاکتامی در استافیلوکوک های کواگولاز منفی با روش‌های فنوتیپی و ژنو تیپی است.

روش کار: در مجموع ۷۱۰ جدایه از نمونه‌های بالینی مراکز درمانی شهر زاهدان جمع‌آوری شدند. بعد از تعیین جنس و گونه کردن نمونه‌های به‌دست‌آمده حساسیت آن‌ها نسبت به ده آنتی‌بیوتیک بتالاکتام با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. برای ردیابی ژن‌های blaZ و mecA از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: از جدایه های به‌دست‌آمده، ۷۹ جدایه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۱۹۸ جدایه استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند. از این میان ۷۴ جدایه (۹۸,۱٪) به پنی‌سیلین، ۶۹ جدایه (۸۷/۳۴٪) به اوگزاسیلین، ۳۱ جدایه (۳۹/۲۴٪) به سفتریاکسون، ۷۱ جدایه (۸۹/۸۷٪) به سفوکسیتین، ۴۳ جدایه (۵۴/۴۳٪) به سفوتاکسیم، ۱۹ جدایه (۲۴/۰۵٪) به سفازولین و ۲۷ جدایه (۳۴/۱۷٪) به سفالکسین در استافیلوکوک ساپروفیتیکوس مقاوم بودند. نتایج حاصل از PCR نیز حضور ژن‌های mecA و blaZ را در بیش‌تر جدایه‌ها تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به فراوانی ژن‌های mecA و blaZ و نتایج آزمون‌های فنوتیپی در بین استافیلوکوکهای کواگولاز منفی، زمینه ظهور شیوع سویه‌های مقاوم به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است.

واژگان کلیدی: کواگولاز منفی، بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به متی سیلین

Par J Med Sci 2016;14 (1):55-62

مقدمه:

استافیلوکوک های کواگولاز منفی (CoNs) یکی از مهم‌ترین پاتوژن ها در ایجاد عفونت‌های ناشی از به‌کارگیری کاتاترهای بیمارستانی است[۱]. این باکتری‌ها دارای ویژگی‌های چسبندگی خاصی هستند که این امر باعث تمایل ارگانیسم به اتصال و کلونیزه شدن در ابزارهای مصنوعی می‌شود [۲]. این گروه که به‌صورت فلورنرمال روی پوست انسان زندگی می‌کنند، در صورت فراهم شدن شرایط، شکل بیماری‌زا به خود گرفته و سبب بروز عفونت می‌شوند [۳]. کواگولاز منفی ها مسئول بروز عفونت‌های گسترده ایی در انسان و دام است و می‌توانند سبب انتشار عفونت‌های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند [۴]. از جمله مهم‌ترین استافیلوکوک های کواگولاز منفی، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس هستند [۵]. این باکتری‌ها که سال‌ها به‌عنوان ساپروفیت محسوب می‌شدند، در دهه‌های اخیر به دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، نظیر سوندها، کاترها و پروتزها به عوامل مهاجم و بیماری‌زا مبدل شده‌اند [۶]. همین امر باعث شده است که این گروه از باکتری‌ها، به‌خصوص دو گونه نام‌برده، جز باکتری‌های عفونی کننده بیمارستانی طبقه‌بندی شوند [۷]. در بیش‌تر مواقع برای درمان

* نویسنده مسئول، نشانی: زاهدان، میدان خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی

تلفن تماس: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵ پست الکترونیک:h.tahmasebi87@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳۰ اصلاح: ۱۳۹۵/۲/۱۳ پذیرش:۱۳۹۵/۳/۳۱

اغلب عفونت‌های با منشأ استافیلوکوک های کواگولاز منفی از داروهای گروه بتالاکتام استفاده می‌شود که سهم نسل‌های جدید سفالوسپورین ها در این زمینه بیش تر است [۸]، اما به دلیل افزایش سریع بروز مقاومت به این گروه از داروها، درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانیسم با این گروه از داروها را با شکست مواجه کرده است [۹]. سازوکار اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در استافیلوکوک ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند [۱۰]. اولین مورد غیرفعال کردن پنی‌سیلین به‌واسطه هیدرولیز حلقه بتالاکتام است. مورد دوم که بیش‌تر در انسان دیده می‌شود، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز و(PBPs) Penicillin Binding Proteins دیواره پروتئین است که سبب کاهش تمایل به دارو شده و منجر به مقاومت وسیعی نسبت به پنی‌سیلین‌های نیمه سنتزی، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها می‌شود [۱۱]. PBP4 و PBP2A انواع دیگری از PBP هستند که به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی سیلین، به این پروتئین بیش‌تر پرداخته می‌شود [۱۲]. بتالاکتامازها به‌طور انتخابی، حلقه بتالاکتام را بازکرده به‌نحوی‌که ساختار تغییریافته دارو نمی‌تواند اتصال مؤثری با PBP ها برقرار کند و در نتیجه سنتز دیواره سلولی ادامه می‌یابد [۱۳]. علاوه بر ژن blaZ حضور ژن mecA هم می‌تواند سبب بروز مقاومت به طیف وسیعی از بتالاکتام از جمله متی سیلین و زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاوم به متی سیلین شود [۱]. ترشح آنزیم‌های بتالاکتاماز علاوه بر این‌که باعث ایجاد مقاومت باکتری در برابر داروهای گروه بتالاکتام می‌شود، سبب ترشح زیاد آن در برخی سویه‌های فاقد ژن عامل مقاومت به متی سیلین شده و موجب بروز مقاومت کاذب (منفی کاذب) به متی سیلین می‌شود [۱۴]. مطالعه روی blaZ نشان داده است این ژن که مقاومت به پنی‌سیلین را کد می‌کند دارای بخش‌های ساختاری، سرکوبگر و یک مبدل سیگنال است که توسط گروه‌های متفاوت blaZ کد می‌شوند [۱۵]. مقاومت‌های ایجادشده در گروه کواگولاز منفی علاوه بر انسان در حیوانات نیز مشاهده‌شده است. برخی از موارد انتقال آن‌ها از راه گوشت و شیر گزارش‌شده است [۱۶, ۱۷]. شناسایی این پاتوژن ها که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی بسیار اهمیت دارند، در بیش‌تر مواقع با روش‌های فاقد حساسیت کافی و غالباً همراه با خطا انجام می‌شود [۱۸].

هدف از انجام این پژوهش، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوک های کواگولاز منفی نسبت به داروهای گروه بتالاکتام و تعیین وجود ژن‌های mecA و blaZ بود.

روش کار:

در این مطالعه توصیفی- مقطعی که در بازه زمانی دی ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۷۱۰ نمونه بالینی کواگولاز منفی به روش نمونه‌گیری آسان و در دسترس از مراکز درمانی شهر زاهدان جمع‌آوری شدند. باکتریایی بودن نمونه‌ها به عنوان معیار ورود در نظر گرفته شد. نمونه‌ها شامل ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه و سرسوند بودند. در آزمایشگاه جدایه‌های استافیلوکوکوس با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد همچون کاتالاز، کواگولاز، تخمیر مانیتول، DNase، مشخص شدند (محیط‌ها: Sigma آمریکا). برای شناسایی استافیلوکوک ساپروفیتکوس از استافیلوکوک اپیدرمیدیس، علاوه بر استفاده از دیسک‌های نوبیوسین و نالدیکسیک اسید (MAST انگلیس)، از آزمون‌های PYR، آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین، تولید اسید از قندهای مالتوز، ترهالوز، مانیتول و سوکروز و عدم تخمیر گلوکوز در شرایط بی‌هوازی، برای جداسازی این دو گونه از یکدیگر انجام گرفت. در روش دیسک دیفیوژن ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هیلتون (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک‌ها را با یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. با استفاده از دیسک‌های نوبیوسین، باسیتراسین و پلی میکسین B استافیلوکوک های اپیدرمیدیس از ساپروفیتیکوس جدا شدند. برای شناسایی استافیلوکوک هومینیس از اپیدرمیدیس نیز از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دیسفریوکسامین استفاده شد. استافیلوکوک ها اپیدرمیدیس در نظر گرفته شدند. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) موردبررسی قرار گرفتند. برای کلیه آزمون‌ها از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰ میکروگرم، سفوکسیتین۳۰میکروگرم، اوگزاسیلین۱ میکروگرم، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم، سفازولین ۳۰ میکروگرم و سفالکسین ۳۰ میکروگرم (همگی Mast انگلستان) با روش دیسک دیفیوژن Kirby-Bauer تعیین شدند. در این روش ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هیلتون (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک‌ها را با یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای به حداقل رساندن آلودگی، دیسک‌ها با فواصل مناسب به‌وسیله

دستگاه Disc Dispenser (Mast انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۵°C، قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند.

میکروتیوب های حاوی BHI جدایه‌های بالینی ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد روی محیط بلاد آگارساب کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس چند کلنی از هر جدایه کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه ایی به تعداد جدایه‌ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان موردنظر (۲۰ ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن انجام شد.

پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت ماکروژن به سفارش شرکت پیشگام ایران بعد از اضافه کردن حجم موردنظر آب مقطر به رقت اولیه ۱۰۰ پیکومولار رسانده و سپس در رقت ۱۵ پیکومولار از پرایمرهای مستقیم و معکوس تهیه شد. بعد از یخچال گذاری پرایمرها به مدت چهار ساعت در یخچال ۴+ درجه سانتی‌گراد، رقت‌های استوک برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- نگهداری شدند. برای انجام PCR از DNAهای استخراجی استفاده شد. در این فرایند از پرایمرهای زیر جهت تکثیر ژن blaZ در نمونه‌های موردنظر استفاده شد.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده‌شده برای شناسایی ژن‌های blaZ و mecA

ژن‌های موردنظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (جفت باز)	مرجع
BlaZ	blaZ F	TACAACTGTAATATCGGAGGG	۳۱۰	Sidhu و همکاران [۱۹]
	blaZ R	AGGAGAATAAGCAACTATATCATC		
MecA	mecA-F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	۵۳۳	Nahaei و همکاران [۲۰]
	mecA-R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

برای انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرو لیتر از محلول نهایی شامل ۱ میکرو لیتر از DNA الگو، ۱ میکرو لیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرو لیتر از مستر میکس 2x and 1.5 mM MgCl2 (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل (Tris-Hcl ،PH8.5, (NH4) SO4, 3mM Mgcl2, 0.2%Tween20 ،MmdNTP 4/4 ،unit Ampliqon polymeras 0/2 Insert red dye and stabilizer) بود استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. سپس آزمون PCR برای ژن mecA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام گرفت. تکثیر نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای ژن blaz و برای ژن mecA شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. تکثیر نهایی هم در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه تنظیم شد.

محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند. برای این کار ۵ میکرو لیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز شد. برای رنگ دهی به ژل، به آن ۵ میکرو لیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه و خوب هم زده شد. سپس در زیر نور ماورای بنفش در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر مولکولی فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) با توالی صد جفت بازی استفاده شد. در نهایت، از ژل حاصل به کمک دستگاه ژل داک (CCD-Tab1 کیاژن ایران) عکس تهیه شد.

داده‌های به‌دست‌آمده به روش آمار توصیفی شامل تعیین فراوانی، درصد و میانگین به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ موردبررسی و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. از آزمون آماری کای مربع برای مقایسه یافته‌های کیفی و از آزمون تی مستقل برای مقایسه یافته‌های کمی استفاده شد. در این مطالعه مقدار $p\leq ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

بررسی‌های انجام‌شده حاکی از آن است که بیش‌ترین میزان مقاومت در بین جدایه های به‌دست‌آمده از باکتری‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مربوط به پنی‌سیلین با بیش از ۹۰٪ مقاومت در هر دو جنس است. بعد از پنی‌سیلین آنتی‌بیوتیک‌های اوگزاسیلین و سفوکسیتین به ترتیب در زمره مقاوم‌ترین گروه‌های بتالاکتامی در این جنس به شمار می‌آیند (جدول ۱). بیش‌ترین جدایه‌های به‌دست‌آمده از کواگولاز منفی مربوط به جدایه‌های جداشده از کشت ادرار (۴۹/۴۹٪ و ۵۵/۶۹٪) و بعد از آن جدایه‌های مربوط به سوندهای ادراری (۳۶/۳۶٪ و ۲۰/۲۵٪) بودند (جدول۲). نتایج مولکولی هم نشان‌دهنده شیوع به نسبت بالای ژن‌های موردمطالعه در جدایه‌های کواگولاز منفی بود. به‌عبارت‌دیگر، در استافیلوکوک ساپروفیتیکوس فراوانی ژن‌های mecA و blaZ به ترتیب ۲۹/۱۱٪ و ۵۹/۴۹٪ و در استافیلوکوک اپیدرمیدیس به ترتیب ۴۸/۹۷٪ و ۷۵/۲۵٪ بودند (جدول شماره ۳). این امر نشان‌دهنده افزایش چشمگیر سویه‌های مقاوم به متی سیلین و سویه‌های حامل ژن blaZ است.

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس

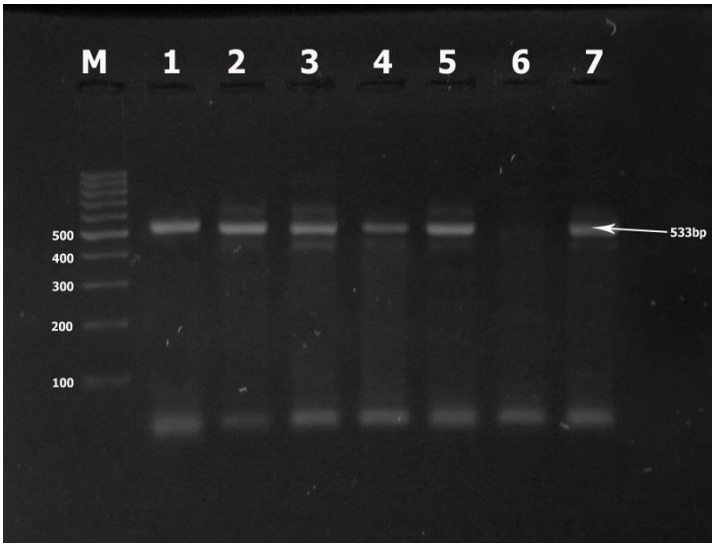
آنتی‌بیوتیک	استافیلوکوک های کواگولاز منفی						p-value (p≤0/05)
	استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=۱۹۸)			استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=۷۹)			
	تعداد مقاوم (درصد)	تعداد نیمه حساس (درصد)	تعداد حساس (درصد)	تعداد مقاوم (درصد)	تعداد نیمه حساس (درصد)	تعداد حساس (درصد)	
سفتریاکسون	۸۴ ۴۲/۴۲	۰	۱۱۴ ۵۷/۵۷	۲۴ ۳۰/۳۷	۵ ۶/۹	۵۰ ۶۳/۲۵	۰/۲۴
سفالکسین	۴۳ ۲۱/۷۱	۱ ۰/۵۷	۱۵۴ ۷۷/۷۷	۱۸ ۲۲/۷۴	۲۳ ۲۹/۱۱	۳۸ ۴۸/۱۰	۰/۱۹
سفکسیم	۵۵ ۲۷/۷۷	۰	۱۴۳ ۷۲/۲۲	۲۰ ۲۵/۳۱	۵ ۶/۳۸	۵۴ ۶۸/۳۵	۰/۳۳
سفوکسیتین	۸۶ ۴۳/۴۳	۰	۱۱۱ ۵۶/۰۶	۲۲ ۲۷/۸۴	۰	۵۷ ۷۲/۱۶	۰/۰۰۴۵
پنی‌سیلین	۸۵ ۴۲/۲۹	۰	۱۱۰ ۵۵/۵۵	۲۶ ۳۲/۹۱	۲ ۲/۸	۵۱ ۶۴/۵۵	۰/۰۳
اگزاسیلین	۸۴ ۴۲/۴۲	۰	۱۱۲ ۵۶/۵۶	۲۳ ۲۹/۱۱	۰	۵۶ ۷۰/۸۸	۰/۰۴۵
سیپروفلوکساسین	۶۱ ۳۰/۸۱	۹ ۴۵/۲۳	۱۲۸ ۶۴/۶۴	۱۳ ۱۶/۴۵	۲۱ ۲۶/۵۸	۴۵ ۵۶/۹۶	۰/۱۱

جدول ۳: فراوانی ژن‌های mecA و blaZ در جدایه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس

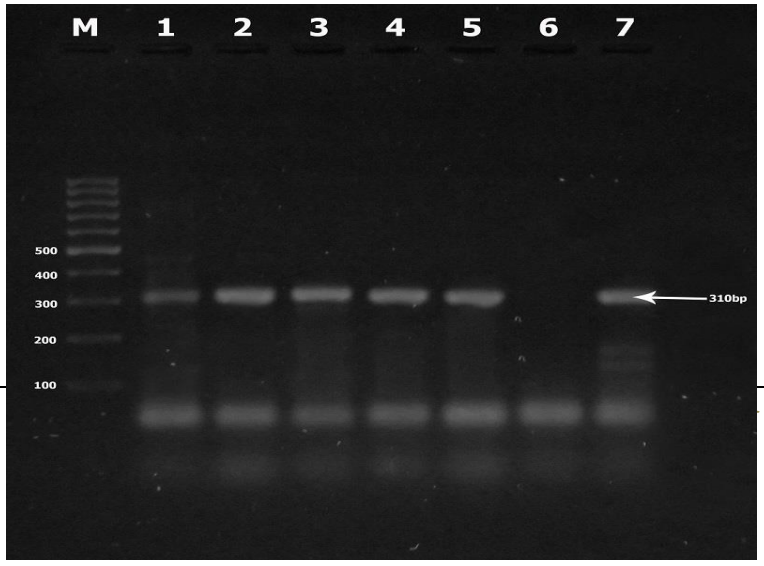
ژن	استافیلوکوک های کواگولاز منفی			
	استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=۱۹۸)		استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=۷۹)	
	تعداد دارای ژن (درصد)	تعداد فاقد ژن (درصد)	تعداد دارای ژن (درصد)	تعداد فاقد ژن (درصد)
mecA	۹۶ ۴۸/۹۷	۱۰۲ ۵۱/۵۱	۲۳ ۲۹/۱۱	۵۶ ۷۰/۸۸
blaZ	۱۴۹ ۷۵/۲۵	۴۹ ۲۴/۷۴	۴۷ ۵۹/۴۹	۳۲ ۴۰/۵۰

جدول ۴: فراوانی جدایه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بر اساس نوع نمونه

نوع نمونه	استافیلوکوک های کواگولاز منفی (n=۲۷۷)	
	استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=۱۹۸)	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=۷۹)
ترشحات زخم	۱۱ ۶/۱۴	۱۷ ۲۱/۵۱
ادرار	۹۸ ۴۹/۴۹	۴۴ ۵۵/۶۹
سواپ	۱۷ ۸/۵۸	۲ ۲/۵۳
سرسوند	۷۲ ۳۶/۳۶	۱۶ ۲۰/۲۵



تصویر ۱: نتیجه ژل الکتروفورز ژن mecA در نمونه‌های بالینی استافیلوکوک کواگولاز منفی.
چاهک M مارکر مولکولی مورداستفاده با طول ۱۰۰ جفت باز. چاهک‌های ۱ تا ۵ نمونه‌های مثبت از نظر ژن mecA. چاهک ۶ کنترل منفی. چاهک ۷ کنترل مثبت.



تصویر ۲: نتیجه ژل الکتروفورز ژن blaZ در نمونه‌های بالینی استافیلوکوک کواگولاز منفی.
چاهک M مارکر مولکولی مورداستفاده با طول ۱۰۰ جفت باز. چاهک‌های ۱ تا ۵ نمونه‌های مثبت از نظر ژن blaZ. چاهک ۶ کنترل منفی. چاهک ۷ کنترل مثبت.

بحث:

با توجه افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی، شیوع بالای مقاومت به بتالاکتام در گروه کواگولاز منفی به یک امر نگران‌کننده تبدیل‌شده است. به‌طوری‌که از نظر فنوتیپی ۹۲٪ از جدایه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ۹۶٪ از جدایه‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس نسبت به پنی سیلی مقاومت از خود نشان دادند که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ژن ژو و همکاران در کشور انگلستان قابل‌مقایسه است [۱۴]. مقاومت به اوگزاسیلین و سفوکسیتین هم بعد از پنی‌سیلین از مقاوم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه بودند که با مشاهدات فیسلر و همکاران در آلمان مشابهت دارد [۲۱]. نتایج حاصل از مطالعه نهایی و همکاران در ایران نشان‌دهنده متفاوت بودن طیف مقاومت به بتالاکتام ها در استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۱۷). در مطالعه ایی که مکی و همکاران در هند روی گروه استافیلوکوک های کواگولاز منفی‌ها انجام دادند، مشخص شد کمترین گونه‌های تشخیصی مربوط به استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس است که با مطالعه حاضر مطابقت ندارد [۷]. مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفازولین از کمترین میزان خود در بین آنتی‌بیوتیک‌های موردبررسی بود که این نتایج با داده‌های به‌دست‌آمده در مطالعه تاکاشی و همکاران در ژاپن و مطالعه نهایی و همکاران در ایران مشابهت دارد [۲۲]. بیش‌ترین نمونه‌هایی که از آن‌ها جدایه‌های باکتریایی به دست آمد مربوط به نمونه‌های ادراری و کمترین نمونه‌های دریافتی مربوط به نمونه‌های زخم و ترشحات زخمی بود. از این نظر با مطالعه ایی که توسط رائی و همکاران انجام شد مشابهت وجود دارد [۱۳]. در این بررسی فراوانی استافیلوکوک های ساپروفیتیکوس مقاوم به متی سیلین ۲۹/۱۱٪ و فراوانی استافیلوکوک های اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین ۴۸/۹۷ مشاهده شد که با مطالعه ماتو و همکاران در برزیل مشابهت دارد [۲۳]. از نظر فراوانی سویه‌های حامل ژن blaZ هم در استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۷۵/۲۵ ٪ و در استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ۲۰/۲۵٪ مشاهده شد. مطالعاتی که اولسن و همکاران در دانمارک روی نوع بندی انواع blaZ و سنجش فراوانی آن‌ها در گروه‌های کواگولاز منفی داشتند، نشان‌دهنده افزایش بسیار زیاد این ژن در بین سویه‌های مختلف استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و اپیدرمیدیس است که با نتایج مطالعه حاضر همسو است [۱۵]. یافته‌های مولکولی با نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های فنوتیپی آنتی بیوگرام هم‌خوانی نشان نمی‌دهد. این اختلاف در بیش‌تر مواقع به خاطر وجود حساسیت کاذب و غیرواقعی در سویه‌های مقاوم به متی سیلین است [۲۴]. در بیش‌تر موارد روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن آنتی بیوگرام برای تعیین پروتکل درمانی این عفونت‌ها نامناسب است [۲۵]. در حال حاضر، مطالعات انجام‌شده در ایران روی مقاومت استافیلوکوک ها به داروهای بتالاکتام در بیش‌تر موارد بر پایه روش‌های فنوتیپی از جمله آزمون آنتی بیوگرام، تعیین حداقل غلظت مهاری و تولید بتالاکتاماز است و مطالعاتی که به‌طور اختصاصی روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس باشد، اندک می‌باشند. از طرفی، تولید بتالاکتاماز یک خطر جدی برای درمان عفونت‌های حاصل از ارگانیسم‌های مشکوک برای تولیدکننده بتالاکتاماز هستند. از این‌رو انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای تعیین رویکرد درمانی مناسب کنترل این عفونت‌ها اغلب با استفاده از آزمون‌های مولکولی دقیق و سریع یک امر لازم و ضروری به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری:

با توجه به فراوانی ژن‌های mecA و blaZ و نتایج آزمون‌های فنوتیپی در بین استافیلوکوک های کواگولاز منفی، زمینه ظهور شیوع سویه‌های مقاوم به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش است. همچنین با تکیه بر نتایج متفاوتی که بین روش‌های فنوتیپی و روش‌های ژنوتیپی در تشخیص استافیلوکوک های کواگولاز منفی مقاوم به بتالاکتام ها دیده شد، می‌توان به این نتیجه رسید که روش‌های فنوتیپی به‌تنهایی قادر به تشخیص قطعی سویه‌های مقاوم نیستند. از طرفی، به دلیل مصرف بالای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی برای درمان بیش‌تر عفونت‌های وابسته به کواگولاز منفی‌ها، باید به یک تشخیص دقیق و قطعی

رسید تا علاوه بر سرعت بخشیدن به درمان، از تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها نابجا نیز جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله از کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی و آزمایشگاه بیمارستان علی ابن ابی‌طالب زاهدان به دلیل همکاری صمیمانه‌شان در به ثمر رسیدن این تحقیق تشکر می‌کنند.

تعارض منافع:

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکردند.

References:

1. Martins A, Riboli DFM, Camargo CH, et al. Antimicrobial resistance and persistence of Staphylococcus epidermidis clones in a Brazilian university hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;77(2):164-8.
2. Siebert WT MN, Williams TW Jr. Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. Southern Med J. 1978;71(11).67-79.
3. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. Clinical Microbiol Rev 2014;27(4):870-926.
4. Martins A, Riboli DFM, Camargo CH, et al Antimicrobial resistance and persistence of Staphylococcus epidermidis clones in a Brazilian university hospital. Diag Microbiol Infect Dis 2013;77(2):164-8.
5. Johannes Huebner M, Donald A. Goldmann M. Coagulase-Negative Staphylococci: Role as Pathogens. Annual RevMedic 1999;50(1):223-36.
6. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-Negative Staphylococci: Pathogens Associated with Medical Progress. Clinical Infect Dise 1994;19(2):231-45.
7. Makki AR, Sharma S, Duggirala A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative staphylococci (CoNS) other than Staphylococcus epidermidis isolated from ocular infections. Investigative Ophthalmol Visual Sci 2011;52(12):9018-22.
8. Dehghan A ,Gholipour A, Nazari R, et al. Molecular investigation of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus isolated in Shahrekord training hospitals. J Shahrekord Uuniv Med Sci 2015;17(2):93-104.
9. Vesterholm-Nielsen M, Olhom Larsen M, Elmerdahl Olsen J, et al. Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Denmark. Acta Vet Scand 1999;40(3):279-86.
10. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014;27(4):870-926.
11. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup F M.Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2006;57 (3) :450-460
12. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. Pediatric Infect Dis J 2005;24(9):817-22.
13. Raei F, Eftekhar F. Studying the presence of blaZ gene and β-lactamase production in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Iranian J Med Microbiol 2008;2(2):35-41
14. Xu Z, Mkrtchyan HV, Cutler RR. Antibiotic resistance and mecA characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Frontiers in Microbiol 2015;6(9):947.-959
15. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2006;57(3):450-60.
16. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. Vet Microbiol 2009;134(2):73-81.
17. Febler AT, Billerbeck C, Kadlec K, et al. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J Antimicrob Chemother 2010. 65(8):1576-82
18. Park JY, Fox LK, Seo KS, 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.
19. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T. Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with β-Lactamase Transposon Tn552 among Clinical Staphylococci. Antimicrobial Agents Chemother 2002;46(9):2797-803.
20. Nahaei MR, Shahmohammadi MR, Ebrahimi S. Milani M. Detection of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci and Surveillance of Antibacterial Resistance in a Multi-Center Study from Iran. Jundishapur J Microbiol 2015;8(8):199-45.
21. Fessler AT, Billerbeck C, Kadlec K. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. Journal Antimicrobial Chemother 2010;65(8):1576-82.
22. Kitao T. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from the fingers of nursing students. J Infect Chemother 2003;9(1):30-4.
23. de Mattos EM, Teixeira LA, Alves VM, et al. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and comparison of different molecular techniques for discriminating isolates of Staphylococcus epidermidis. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2003;45(1):13-22.
24. Jarlov JO. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci typing and antibiotic

XTT colorimetry. J Antimicrob Chemother 2005;56(2):331-6.

susceptibility. APMIS Supplementum. 1999;9(1):1-42.

25. Cerca N, Martins S, Cerca F, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid

Original Article

Phenotypic and molecular study of beta-lactam resistance in coagulase-negative staphylococci samples

Tahmasebi Hamed*[1], Bokaeian Mohammad[2], Adabi Javad[1]

Received:12/12/2015 Revised:05/02/2015 Accepted: 06/20/2016

1. Dept of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of medical science, Zahedan, Iran
2. Dept of Microbiology,School of Medicine, Center-tropical infectious diseases Zahedan Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.1, Spring 2016

Par J Med Sci 2016;14(1):55-62

Abstract

Introduction:

The emergence of resistance to beta-lactam antibiotics is one of the most common resistance cases in *Staphylococcus*, including coagulase-negative *Staphylococcus* in hospital pathogens. Therefore, detection of resistance factors can be helpful in treatment process. This study aimed to determine betalactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* by phenotypic and genotypic methods.

Materials and Methods:

Totally, 710 isolates were collected from clinical samples in health centers of Zahedan. After genus and species of isolates were determined, their sensitivity to 10 beta-lactam antibiotics was measured via disc diffusion method. PCR and specific primers were used to trace *blaZ* and *mecA* gens.

Results:

Of the total samples, 79 isolates were *Staphylococcus saprophyticus* and 198 isolates were *Staphylococcus epidermidis*. The resistance profile of the *Staphylococcus saprophyticus* isolates is as follows: 74 isolates (98.1%) to penicillin, 69 isolates (34.87%) Oxacillin, 31 isolates (24.39%) to ceftriaxone, 71 isolates (87.89%) to Cefoxitin, 43 isolates (43.54%) to cefotaxime, 19 isolates (24.50%) to cefazolin and 27 isolates (17.34%) to cephalexin. PCR results confirmed the presence of *mecA* and *blaZ* in most isolates.

Conclusion:

Given the frequency of *mecA* and *blaZ* genes and phenotypic test results in coagulase negative *Staphylococcus*, resistant to different groups of antibiotics is on the rise.

Keywords: Coagulase-Negative, Beta-Lactam, Antibiotic Resistance, Methicillin Resistance