مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی ژن‌های qacA/B و smr در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی مقاوم به متی سیلین

نویسندگان:

محمدبکائیان[۱و۲]، جواد ادبی[۱]، حامدطهماسبی[۱*]

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

۲- مرکز بیماری‌های عفونی گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

چکیده:

مقدمه: افزایش مصرف مواد ضدعفونی‌کننده باکتری‌کش منجر به پیدایش سویه‌های استافیلوکوکوس مقاوم به این مواد شده است. برخی از پژوهش‌ها همراهی ژن‌های عامل مقاومت به متی سیلین با این عوامل را تأیید کرده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن‌های مقاوم به مواد بیوسایدی همچون qac A/B وsmr در استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی است.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نمونه‌های بالینی طی مدت نه ماه جمع‌آوری شد. بعد از آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه و تأیید جدایه ها از نظر جنس و گونه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن‌های aqcA/B و smr با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری کای مربع تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۳۶ جدایه (۶۰ ٪) دارای ژن mecA بودند. از این تعداد، ۱۹ جدایه (۵۲/۷۷ ٪) دارای ژن qacA و ۲۱ جدایه (۵۸/۳۳ ٪) داری ژن smr بودند. همچنین از ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپی درمیدیس، ۲۷ جدایه (۵۵/۱ ٪) دارای ژن mecA بودند که از این میان ۱۱ جدایه (۲۲/۴۴ ٪) دارای ژن qacA/B و ۸ جدایه (۱۶/۳۲ ٪) دارای ژن smr بودند.

نتیجه‌گیری: در نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، حضور گسترده ژن‌های qac A/B و smr در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی مقاوم به متی سیلین مشاهده شد. با توجه به حضور کم ژن های smr و qacA/B در ایزوله های حساس به آنتی بیوتیک، بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی برای درمان عفونت‌های میکروبی، ضروری است.

واژ گان کلیدی: مقاومت داروئی، استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین، qacA/B

Pars J Med Sci 2016;14 (3):9-18

مقدمه:

کوکسی های گرم مثبت طیف بسیار گسترده ای از جنس و گونه‌های باکتریایی را در خود جای‌داده‌اند که هرکدام از این باکتری‌ها به‌نوبه خود سهم بالایی در ایجاد عفونت‌های اولیه و ثانویه دارند [۱]. استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای این گروه در ایجاد عفونت‌های ناشی از به‌کارگیری کاتاترهای بیمارستانی هستند [۱]. این باکتری‌ها دارای ویژگی‌های چسبندگی خاصی هستند که این امر باعث تمایل ارگانیسم به اتصال و کلونیزه شدن در ابزارهای مصنوعی می‌شوند [۲]. این گروه که به صورت فلور نرمال روی پوست انسان زندگی می‌کنند، در صورت فراهم شدن شرایط، شکل بیماری‌زا به خود گرفته و سبب بروز عفونت می‌شوند [۳]. استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی مسئول بروز عفونت‌های گسترده ای در انسان و دام بوده و می‌توانند سبب انتشار عفونت‌های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند[۴]. استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از مهم‌ترین استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی می‌باشند [۵]. این باکتری‌ها که سال‌ها به‌عنوان ساپروفیت محسوب می‌شدند، در دهه‌های اخیر به دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، مانند

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

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

دریافت: ۹۵/۴/۲۵ اصلاح: ۹۵/۸/۷ پذیرش: ۹۵/۸/۱۸

سوندها، کاترها و پروتزها به عوامل مهاجم و بیماری‌زا مبدل شده‌اند[۴]. این امر باعث شده است که این گروه از باکتری‌ها، به‌خصوص دو گونه نام‌برده، جزو باکتری‌هایی که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند، طبقه‌بندی شوند[۵]. در بیشتر مواقع برای درمان عفونت‌های با منشأ استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی از داروهای گروه بتالاکتام استفاده می‌شود که سهم نسل‌های جدید سفالوسپورین ها در این زمینه بیشتر است [۶]. درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانیسم با این گروه از داروها به دلیل افزایش سریع بروز مقاومت به آن‌ها با شکست مواجه شده است[۶]. حضور این باکتری‌های مقاوم در سطوح مختلف و استفاده از مواد بیوسایدی و ضدعفونی‌کننده، زمینه لازم برای ظهور سویه‌های مقاوم به مواد ضدعفونی‌کننده را در بین سویه‌های مقاوم افزایش می‌دهد[۳]. کلرهگزیدین و ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان از پرکاربردترین باکتری‌کش های بیمارستانی هستند که هم برای ضدعفونی کردن سطوح و هم در برخی موارد برای ضدعفونی وسایل مورد استفاده قرار می‌گیرند[۶]. حضور ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتام ها از جمله mecA می‌تواند زمینه لازم جهت پایداری باکتری در برابر درمان را ایجاد کند[۷]. این ژن در کنار ژن‌های عامل مقاومت به مواد ضدعفونی‌کننده می‌تواند باعث ظهور سویه‌های مقاومی شود که علاوه بر مقاومت ذاتی در برابر درمان، در برابر مواد بیوسایدی نیز از خود مقاومت نشان دهند [۷]. ژن‌های qacA/B و smr از جمله ژن‌هایی هستند که مقاومت به کلرهگزیدی و آنتیموان های چند ظرفیتی را سبب می‌شوند [۸]. در برخی مطالعات انجام‌شده، ظهور ژن‌های عامل مقاومت qac همراه با ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تری متوپریم، پنی سیلین، کانامایسین و توبرامایسین روی عناصر ژنتیکی متحرک یافت شده‌اند [۹،۱۰]. گزارش افزایش جهش‌های ژنی در کنار عناصر متحرک وابسته به پلاسمید ها در بین باکتری‌های مقاومی که حامل ژن‌های mecA می‌باشند گزارش‌شده است [۱۱]. ژن‌های qac A،qac B،smr معمولاً روی پلاسمید حمل می‌شوند و به‌واسطه این ویژگی، قدرت انتقال بالایی پیداکرده‌اند [۱۲]. ژن‌های دیگری از جمله qac J وqac H وqac G هم در گروه qac در استافیلوکوکوس ها مورد مطالعه قرارگرفته‌اند که از نمونه‌های دامی و مواد غذایی- لبنی جداسازی شده‌اند [۱۳ و ۱۴]. با توجه به اهمیت مصرف مواد باکتری‌کش در بیمارستان‌ها برای ضدعفونی ابزار پزشکی و سطوح، ظهور باکتری‌هایی که به این مواد مقاوم هستند می‌تواند زمینه بروز عفونت‌های شدیدی را فراهم کند. از این رو هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌های qacA/B و smr در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس-های کوگولاز منفی مقاوم به متی سیلین بود.

روش کار:

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۴۴۸ نمونه بالینی به مدت ۹ ماه در بازه زمانی بهمن‌ماه ۱۳۹۳ تا اواخر آذرماه ۱۳۹۴ از مراکز درمانی شهر زاهدان به شیوه آسان و در دسترس جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها شامل ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه و سر سوند بودند. معیار ورود به مطالعه، بیمارانی بودند که به مدت طولانی در بیمارستان بستری بوده و دچار عفونت‌های باکتریایی شده بودند. در آزمایشگاه ایزوله‌های استافیلوکوکوسوس با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد همچون کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول و dNase مشخص شدند. برای شناسایی استافیلوکوکوس ساپروفیتکوس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس علاوه بر استفاده از دیسک‌های نووبیوسین و نالدیکسیک اسید (MAST، انگلستان)، از آزمون‌های PYR (Hardy Diagnostics، آمریکا) آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین و تولید اسید از قندهای مالتوز، ترهالوز، مانیتول و سوکروز و عدم تخمیر گلوکز در شرایط بی‌هوازی (با استفاده از انکوباتور CO2 دار) برای جداسازی این دو گونه استفاده شد. در روش دیسک انتشاری ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و از این سوسپانسیون روی محیط Muller Hintion agar (Merck، آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک با یک پنس سترون روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. با استفاده از دیسک‌های نووبیوسین، باسیتراسین و پلی میکسین B (همگی MAST، انگلستان) استافیلوکوکوس های اپیدرمیدیس از ساپروفیتیکوس شناسایی شد. برای جداسازی استافیلوکوکوس هومینیس از اپیدرمیدیس از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دیسفریوکسامین استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تمامی آزمون‌ها از سویه استافیلوکوکوسوس اورئوس ATCC 25923 به‌عنوان کنترل منفی و از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228، سویه استاندارد استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ATCC 15305 و سویه استاندارد استافیلوکوکوس هومنیس ATCC 27844 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جدایه های تأییدشده استافیلوکوکوس اپی درمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با استفاده از میکرو تیوب‌های حاوی Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Merck، آلمان) و ۱۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- ذخیره‌سازی شدند [۱۸-۱۳].

استخراج ژنومی

از میکروتیوب های حاوی Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Merck، آلمان) جدایه های بالینی نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد روی Muller Hinton agar (Merck، آلمان) کشت داده شد و سپس چند پرگنه از هر جدایه کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Loria Bertani Broth (merck، آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه ای به تعداد جدایه ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند [۱۹]. بعد از۲۰ ساعت، لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن انجام شد. در نهایت محصولات DNA به‌دست‌آمده بعد از سنجش کمی و کیفی توسط ژل آگارز ۱ درصد، برای انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر۲۰- نگهداری شدند.

آماده‌سازی پرایمرها و آزمایش PCR

پرایمرهای مورد نظر بعد از اضافه کردن آب مقطر دیونیزه برای مدت ۴ ساعت در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس رقت‌های ذخیره برای انجام آزمایش‌های بعدی تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شدند. در این فرایند از پرایمرهای زیر برای تکثیر ژن‌های qacA/B، mecA و smr در نمونه‌ها استفاده شد.

جهت انجام واکنش PCR برای هر ژن، 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 میکسMgCl2 2x and 1.5 mM (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل Tris-Hcl PH8.5, (NH4) SO4, 3mM Mgcl2, 0.2%Tween20، MmdNTP 4/4، 0/2 unit Ampliqon polymeras، Insert red dye and stabilizer بود، برای تهیه میکس اولیه استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد [۱۴]. آزمون PCR برای ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، طبق الگوی تنظیم زیر انجام شد.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده‌شده برای شناسایی ژن‌های qacA/B، mecA و smr جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی

ژن‌های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (bp)	رفرنس
qacA/B	qacA/B F qacA/B R	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	۱۵۷	Raggi و همکاران[۲۰]
mecA	mecA-F mecA-R	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	۵۳۳	Nahaei و همکاران[۲۱]
smr	smr F smr R	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	۱۹۵	Noguchi و همکاران[۲۲]

جدول۲: سیکل‌های حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ژن‌های qacA/B، mecA و smr در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی

ژن	مراحل	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
qacA/B	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جدا شدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
	جفت شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طویل شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱
mecA	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جدا شدن قطعات DNA	۹۴	۳۰	
	جفت شدن پرایمرها	۵۵	۳۰	۳۰
	طویل شدن پرایمرها	۷۲	۳۰	
	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۸۰	۱
smr	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جدا شدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
	جفت شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طویل شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

محصولات PCR ژن‌های qacA/B، mecA و smr هر کدام به ترتیب با طول ۱۵۷، ۵۳۳ و ۱۹۵ جفت باز 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 به هم زده شد. سپس ژل‌ها و باندهای آن‌ها در زیر نور ماورای بنفش در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس لومیناتور (UVT-20 SML، آمریکا) مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر مولکولی فرمنتاز (Thermofisher، آمریکا) با توالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد [۱۷]. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک (کیاژن مدل CCD-Tab1، ایران) عکس‌برداری شد. در همه آزمایش‌های مولکولی از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 7644 برای حضور ژن qacA/B، سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 برای حضور ژن mecA استفاده شد [۱۰].

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه وتحلیل شدند. از روش‌های آماری توصیفی برای تعیین فراوانی، درصد و میانگین، از آزمون آماری کای مربع برای مقایسه یافته‌های کیفی و از آزمون تی مستقل برای مقایسه یافته‌های کمی استفاده شد. در این مطالعه مقدار $p \leq ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

از تعداد ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جداشده از نمونه‌های بالینی بخش‌های مختلف بیمارستانی، ۱۳ جدایه (۲۱/۶۶٪) از زخم، ۴ جدایه (۶/۶۶٪) از شالدون و کاتاترها، ۴۰ جدایه (۶۶/۶۶) از ادرار و ۳ جدایه (۵٪) از خون، جداسازی شدند. بیشترین جدایه های به‌دست‌آمده مربوط به زنان بود (جدول ۳). در این بین ارتباط معناداری بین گونه‌های به‌دست‌آمده و جنسیت بیمارانی که نمونه‌های بالینی از آن‌ها گرفته‌شده بود، مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). از ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌دست‌آمده ۵ جدایه (۱۰/۸۲٪) از زخم، ۱۵ جدایه (۳۰/۴۵٪) از شالدون و کاتاترها، ۲۸ جدایه (۵۷/۱۵٪) از ادرار و ۱ جدایه (۲/۵٪) از خون بود (جدول ۴).

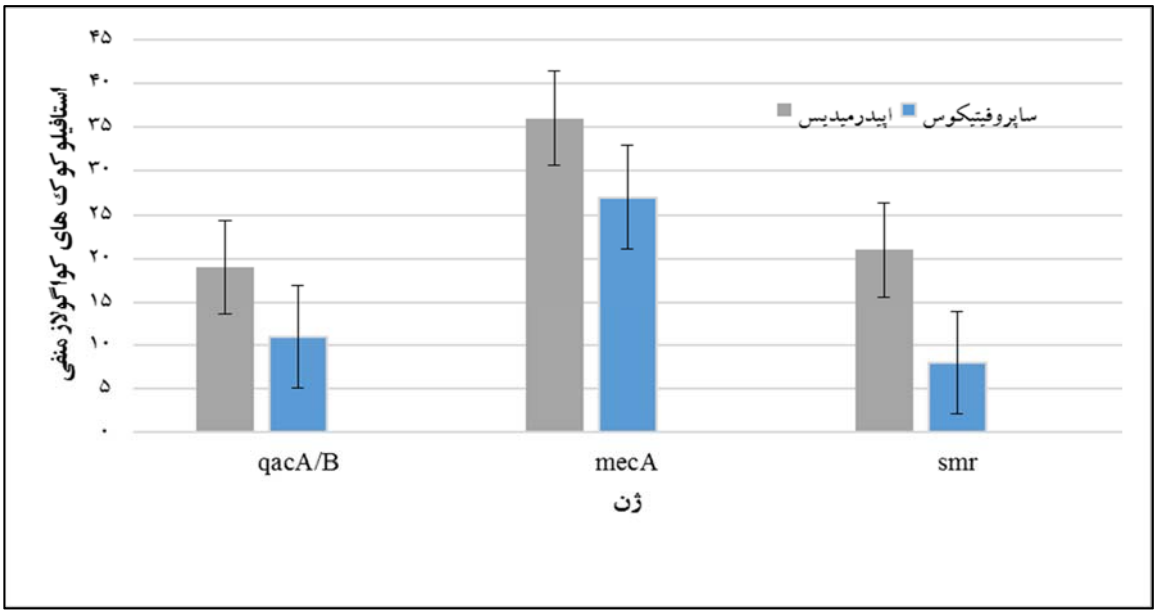
از مجموع این ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۳۶ جدایه (۶۰ ٪) دارای ژن mecA، ۱۹ جدایه (۵۲/۷۷ ٪) دارای ژن qacA/B و ۲۱ جدایه (۵۸/۳۳ ٪) دارای ژن smr بودند. همچنین از ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۲۷ جدایه (۵۵/۱ ٪) دارای ژن mecA، ۱۱ جدایه (۲۲/۴۴ ٪) دارای ژن qacA/B و ۸ جدایه (۱۶/۳۲ ٪) دارای ژن smr بودند (نمودار۱). بر اساس نتیجه آزمون آماری کای مربع مقادیر P valve برای ژن‌های mecA، qacA/B و smr به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۵ به دست آمد که ارتباط معناداری بین حضور ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های عامل مقاومت به شوینده‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها مشاهده شد، بطوریکه بیشتر نمونه هایی که از نظر حضور ژن mecA مثبت بودند، از نظر حضور ژن های qacA/B و smr نیز مثبت بودند. ارتباط معناداری بین نوع گونه‌های استافیلوکوکوس و نمونه‌های بالینی مشاهده نشد. در ضمن بعد از انجام مراحل ژل الکتروفورز محصولات به‌دست‌آمده از ژن‌های mecA، qacA/B و smr باندهای مورد نظر با وزن مولکولی به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ مشخص شدند (تصویر۱و۲).

جدول۳: فراوانی جدایه های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس جنسیت بیمار smr، qacA/B و mecA در استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی

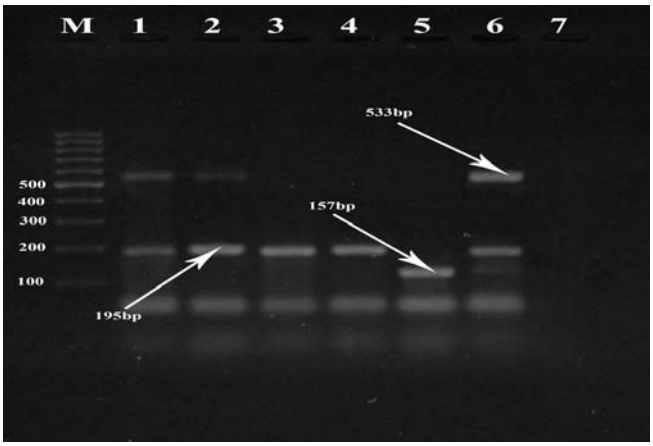
جنسیت بیمار	استافیلوکوکوسوک کواگولاز منفی (n=۱۰۹)		P value
	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (n=۴۹)	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (n=۶۰)	
	تعداد (٪)	تعداد (٪)	
زن	۳۹ (٪۷۹٫۵۹)	۴۶ (٪۷۶٫۶۶)	۰٫۶۹
مرد	۱۰ (٪۳۲٫۶۵)	۹ (٪۲۳٫۳۳)	۰٫۵۶

جدول۴: فراوانی جدایه های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس نوع نمونه و بخش بیمارستانی جداشده

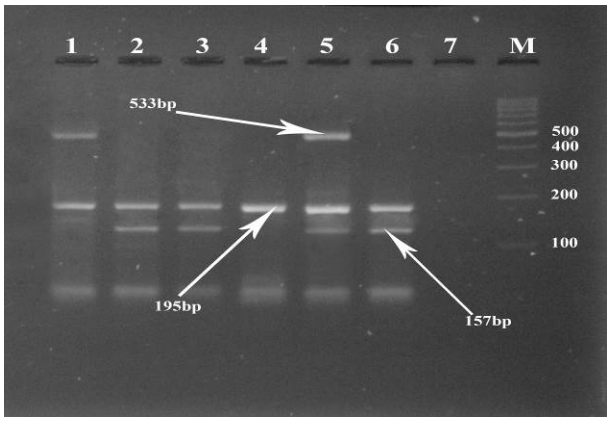
استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (n=۱۰۹)								
بخش جداشده	ادرار (٪)		زخم (٪)		خون (٪)		شالدون- کاتاتر (٪)	
	اپیدرمیدیس	ساپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	ساپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	ساپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	ساپروفیتیکوس
اطفال	۴ (٪۸/۱)	۱ (۱/۶)	۱ (٪۲)	۲ (٪۴)	۰	۰	۱ (٪۲)	۴ ٪۱۴
ICU	۰	۰	۴ (٪۸)	۱	۲ (٪۴)	۰	۰	۱ ٪۸
داخلی-جراحی	۰	۰	۱ (٪۲)	۱ (٪۴)	۰	۱ (۱/۶)	۲ (٪۴)	۱ ٪۸
P-ICU	۰	۰	۰	۱ (٪۱)	۰	۰	۱ (٪۲)	۰
N-ICU	۰	۰	۱ (٪۲)	۰	۰	۰	۰	۱
بیماران سرپایی	۲۳ (٪۴۶/۹۳)	۱۹ (۳۱/۶۶)	۵ (٪۱۰)	۰	۰	۰	۰	۰
زنان	۱۳ (٪۲۶/۵۳)	۸	۲ (٪۴)	.	۱ (٪۲)	۰	۰	۴
خون‌شناسی	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۲



نمودار۱: فراوانی ژن‌های smr، qacA/B و mecA در استافیلوکوک های کوگولاز منفی



شکل شماره۱: نتیجه تکثیر ژن‌های mecA، smr وqacA/B مربوط به عامل مقاومت به متیسیلین و عامل مقاومت به بیوسایدها و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس. چاهک شماره‌های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه‌هایی که از نظر ژن‌های mecA، smr وqacA/B مثبت بودند. وزن مولکولی این قطعات به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ می‌باشد. M مارکر۱۰۰bp می‌باشد. چاهک ۶ کنترل مثبت. چاهک۷ کنترل منفی.



شکل شماره۲: نتیجه تکثیر ژن‌های mecA، smr و qacA/B مربوط به عامل مقاومت به متیسیلین و عامل مقاومت به بیوسایدها و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس. چاهک شماره‌های ۱ تا۵ مربوط به نمونه‌هایی که از نظر ژن‌های mecA، smr و qacA/B مثبت بودند. وزن مولکولی این قطعات به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ می‌باشد. M مارکر۱۰۰bp می‌باشد. چاهک ۷ کنترل منفی. چاهک ۵ کنترل مثبت.

بحث:

استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده و بیوسایدها از سال ۱۹۴۰ اهمیت ویژه ای پیداکرده‌اند، به‌طوری‌که در بیشتر مواقع، در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها، اولین اقدام برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی و آشکار، استفاده از مواد بیوسایدی بوده و هست [۱۸]. امروزه مصرف بیش از اندازه مواد بیوسایدی ضدمیکروبی منجر به ظهور سویه‌هایی با مقاومت ژنتیکی به این مواد شده است [۱۸]. استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی، می‌توانند از طریق آلوده کردن سطوح و ابزارآلات پزشکی نقش مهمی را در ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان ایفا کنند [۱۹]. در این مطالعه، بیشترین نمونه‌های بالینی به‌دست‌آمده از دو باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، از نمونه‌های بالینی مربوط به زنان بود. این امر توجیه‌کننده حضور برخی از گونه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس در ایجاد عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان می‌باشد. همچنین بیشتر نمونه‌هایی که از آن‌ها باکتری‌های مذکور جداسازی شدند، نمونه‌های ادراری بود. این موضوع نشان‌دهنده نقش و حضور طیف وسیعی از اسافلیلوکوک های کوگولاز منفی در بروز عفونت‌های ادراری، به‌خصوص در زنان است، به‌طوری‌که ۱۳ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۸ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از نمونه‌های ادراری از بخش زنان جداسازی شد. آنچه که باعث تفاوت مطالعه حاضر از سایر مطالعات داخلی شده است، بررسی حضور ژن‌های مقاومت و همینطور سنجش حساسیت سویه‌های مقام به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی متفاوت استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی نسبت به ماده بیوسایدی حاوی QACs است .نتایج این مطالعه نشان داد که از مجموع ۴۴۸ نمونه بالینی مورد بررسی، ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۴۹ نمونه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بودند.

این موضوع فراوانی استافلیوکوک اپیدرمیدیس را در بین استافلیوکوک های کوگولاز منفی نشان می‌دهد که نتایج با مطالعه کوکسال و همکاران مطابقت دارد. این مطالعه که در سال ۲۰۰۹ در ترکیه روی گونه‌های مختلف جنس استافیلوکوکوس انجام‌شده بود، نشان داد که در بین گونه‌های کواگولاز منفی جنس استافیلوکوکوس دو باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دارای بیشترین فراوانی بوده و بالاترین فراوانی مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس است [۲۰]. از مجموع ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۱۹ جدایه دارای ژن qacA/B، ۲۱ جدایه دارای ژن smr و ۳۶ جدایه دارای ژن mecA بودند. این نتایج با بررسی‌های انجام‌شده توسط اسکوگارد و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در دانمارک انجام شد مشابهت دارد. همچنین در مطالعه حاضر وجود یا عدم وجود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به بیوساید ها و مقاومت به متی سیلین مورد بررسی قرار گرفت. با تحلیل داده‌ها و مقادیر p value به‌دست‌آمده از ژن‌های smr (۰/۰۰۵۶) و aqcA/B (۰/۰۰۱۹) و mecA (۰/۰۰۱۳۶) ارتباط معنی داری بین حضور ژن های عامل مقاومت به شوینده ها و ژن عامل مقاومت به متی سیلین دیده شد. بطوریکه در بیشتر نمونه هایی که از نظر حضور ژن mecA مثبت بودند، ژن های qacA/B و smr دیده شد. همچنین مطالعه اسکوگارد و همکاران نشان داد که جدایه هایی که از نظر حضور ژن‌های qacA/B و smr مثبت بودند، از نظر مقاومت به پنی سیلین، سفوکسیتین و اریترومایسین دارای بالاترین فراوانی هستند [۲۱]. بیشترین میزان فراوانی ژن‌های mecA، qacA/B و smr در نمونه‌های بالینی به‌دست‌آمده از ادرار و زخم بود که از این نظر با مطالعه انجام گرفته توسط مختاریان و همکاران در گناباد که در سال ۲۰۱۴ روی نمونه‌های ادراری انجام گرفت، مشابه است. در مطالعه مختاریان و همکاران مهمترین عامل مسبب عفونت‌های ادراری در زنان وابسته به کوگولاز منفی‌ها، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بود. همچنین بیشترین و کمترین میزان مقاومت در این گروه متعلق به آنتی‌بیوتیک های پنی سیلین و ونکومایسین گزارش‌شده است که نزدیک به مطالعه حاضر می‌باشد [۲۲]. مطالعه انجام‌شده توسط عربستانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شهر همدان نشان داد که استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوسوس اپیدرمیدیس در عفونت‌های وابسته به کواگولاز منفی‌ها در زنان بیشترین نقش را داشته و از این دو بیشترین سهم را ساپروفیتیکوس دارد. از طرف دیگر، بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک هایی همچون پنی سیلین در این گروه مشاهده شد. همچنین در این مطالعه مقاومت به ونکومایسین در استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دیده نشد که مشابه مطالعه حاضر می‌باشد [۲۳]. از مجموع ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف، بیشترین جدایه های به‌دست‌آمده از نمونه‌های ادراری و کاتاترها بود. از نظر پراکندگی ژن‌ها، ۲۷ جدایه دارای ژن mecA، ۸ جدایه دارای ژن smr و ۱۱ جدایه دارای ژن qacA/B بودند. این نتایج با مطالعات انجام‌شده توسط ازمانتر و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تونس که نشان‌دهنده سهم بالای ژن mecA و بعد از ان qacA/B بود، مشابهت دارد [۲۴]. حضور همزمان ژن‌های qac A/Bبیان کننده ارتباط حضور این ژن‌ها با ژن عامل مقاومت به متی سیلین (mecA) بود. هورنر در سال ۲۰۱۲ در یک مطالعه مروری وجود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک ها، ژن‌های عامل مقاومت به برخی بیوسید ها را گزارش کرد[۲۵]. در مطالعات لانگتین و همکاران (کانادا- ۲۰۰۵)، مک گان و همکاران (آمریکا- ۲۰۰۳)، والی و همکاران و نوگوچی و همکاران (ژاپن- ۱۹۹۲) نبود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی سیلین و ژن‌های عامل مقاومت به بیوسایدها گزارش شد که با نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه همخوانی ندارد. در مطالعات یاد شده فراوانی ژن smr بیشتر از qacA/B گزارش‌شده است که از این نظر نیز با مطالعه حاضر که باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شیوع ژن qacA/B نسبت به شیوع ژن smr بیشتر می‌باشد، همخوانی ندارد[۲۸-۲۶]. ازمانتر و همکاران، لی لاپرن و همکاران و سیدو و همکاران در مطالعات جداگانه ایی که روی حضور ژن‌های عامل مقاومت به متی سیلین و بیوساید ها پرداخته بودند، فراوانی بالای ژن qacA/B را نسبت به ژن smr گزارش کردند. در نتایج مطالعه حاضر روی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شیوع ژن qacA/B نسبت به شیوع smr کمتر می‌باشد [۳۰،۲۹]. اختلافات موجود در نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر با سایر مطالعات داخلی و خارجی را می توا ن به تفاوت سویه‌های باکتریایی با توجه به تفاوت‌های مکانی نسبت داد. حضور بالای این ژن‌ها در نمونه‌های بالینی، به‌خصوص نمونه‌های خون و ادرار بیان کننده ظهور عفونت‌هایی است که بر پایه استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی استوار بوده که علاوه بر داشتن ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها، دارای ژن‌های مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌ها نیز می‌باشد.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این پژوهش، حاکی از شیوع ژن‌هایی است که زمینه مساعدی برای مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های مهم دارند. پژوهش حاضر به‌عنوان یکی از معدود پژوهش‌های انجام‌شده در ایـران که حـضور ژن‌های qac A/B و smr را در استافیلوکوکوسوس های کوگولاز منفی مـورد بررسی قرار داده

است، ضرورت وجود توجه بیشتر و تحقیق گسترده‌تر در زمینه نوع و همچنین میزان ماده بیوسایدی مصرفی در محصولات بیوسایدی را بیان می‌کند .از سوی دیگر در بررسی حاضر ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به QACs و مقاومت به متی سیلین به دست آمد. در نتیجه، حضور هر کدام از این شاخص‌های مقاومت می‌تواند به گزینش مشترک این دو به دنبال درمان آنتی‌بیوتیکی و یا به دنبال مصرف مواد ضدعفونی‌کننده حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیوم منجر شود.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از مسئولین مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی-گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیته اخلاق ir.zaums.rec.1394.250 می‌باشد و بودجه آن از محل طرح‌های تحقیقاتی تأمین شده است.

تعارض منافع:

نویسندگان مقاله حاضر هیچ گونه تعارض منافع با توجه به تألیف و یا انتشار اعلام نکرده‌اند.

References:

1. Nawattanapaiboon K, Prombun P, Santanirand P, et al. Hemoculture and Direct Sputum Detection of mecA-Mediated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with a Lateral-Flow Dipstick. J Clin Lab Anal 2016; 17(10): 2193-5.
2. Siebert WT MN, Williams TW Jr. Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. South Med J 1978;71(11):130-145.
3. Gillaspy AF, Iandolo JJ. Staphylococcus. In: Schaechter M (eds). Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2009; 11(9):293-303.
4. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-Negative Staphylococci: Pathogens Associated with Medical Progress. Clin Infect Dis 1994;19(2):231-45.
5. 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. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52(12):9018-22.
6. Babaei M, Sulong A, Hamat R, et al. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant Acinetobacter baumannii in Malaysia. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2015;(14):11.190-211.
7. Warren DK, Prager M, Munigala S, et al. Prevalence of qacA/B Genes and Mupirocin Resistance Among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates in the Setting of Chlorhexidine Bathing Without Mupirocin. Infect Control Hosp Epidemiol 2016;8 (11):1-8.
8. Noguchi N, Suwa J, Narui K, et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Asia during 1998 and 1999. J med microbiol 2005;54(Pt 6):557-65.
9. McGann P, Kwak YI, Summers A, et al. Detection of qacA/B in clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a regional healthcare network in the eastern United States. Infect Control Hosp Epidemiol 2011;32(11):1116-9.
10. Teixeira CF, Pereira TB, Miyazaki NH, et al. Widespread distribution of qacA/B gene among coagulase-negative Staphylococcus spp. in Rio de Janeiro, Brazil. J Hosp Infect 2010;75(4):333-4.
11. Mc Gann P, Milillo M, Kwak YI, et al. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes qacA/B and mupA in clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;77(3):270-2.
12. Zheng R, Wang M, He B, et al. Identification of active efflux system gene qacA/B in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its significance. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2009;34(6):537-42.
13. Antunes AL, Secchi C, Reiter KC, et al. Feasible identification of Staphylococcus epidermidis using desferrioxamine and fosfomycin disks. APMIS 2008;116(1):16-20.
14. Marrie TJ, Kwan C. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus saprophyticus and urethral staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1982;22(3):395-7.
15. Raggi C, Filippini P, Monaco M, et al. Methicillin Resistance, Biofilm Formation and Resistance to Benzalkonium Chloride in Staphylococcus *aureus* Clinical Isolates. Clin Microbial 2013; 2(10):121.135
16. Nahaei MR, Shahmohammadi MR, Ebrahimi S, et al. 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):1994-5.
17. Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, et al. Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution among Methicillin-Resistant Staphylococcus *aureus aureus* Isolates from Patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. J Clin Microbiol 2006;44(6):2119-25.

18.Miyazaki NH, Abreu AO, Marin VAet al. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(4):539-40.
19.Nakipoglu Y, Ignak S, Gurler N, et al. The prevalence of antiseptic resistance genes (qacA/B and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains. Mikrobiyol Bul 2012;46(2):180-9.
20.Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. Microbiol Res 2009;164(4):404-10.
21.Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, et al. Recently introduced qacA/B genes in Staphylococcus epidermidis do not increase chlorhexidine MIC/MBC. J Antimicrob Chemother 2013;68(10):2226-33.
22.mokhtarian DALUE h, GHAHRAMANI M, minooean mh, et al. Antibiotic susceptibility pattern of coagulase negative Staphylococci isolated from urinary tract infection in Gonabad. Q Horizon Med Sci 2014;19(5):1-7. (Persian)
23.Arabestani MR, Mahmoudi H, Alikhani M, et al. Evaluation Prevalence agents of urinary tract infection and antibiotic resistance in patients admitted to hospitals in Hamedan University of Medical Sciences 1391-92.Pajouhan Sci J 2014; 12(13): 20-27.(Persian)
24.Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, et al. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes 2011;4(1):1-9.
25.Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? J Antimicrob Chemother 2012;67(11):2547-59.
26.Longtin J, Seah C, Siebert K, et al. Distribution of antiseptic resistance genes qacA, qacB, and smr in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(6): 2999–3001.
27.McGann P, Kwak YI, Summers A, et al. Detection of qacA/B in clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a regional healthcare network in the eastern United States. Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32(11): 1116–9
28.Noguchi N, Hase M, Kitta M, et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett 1999; 172(13): 247–53.
29.Leelaporn A, Paulsen IT, Tennent JM, et al. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J Med Microbiol 1994; 40(9): 214–20.
30.Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with b-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(11): 2797–803.

Original Article

The frequency of qacA/B and smr genes in clinical isolates of methicillin resistance coagulase negative staphylococci

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

Received: 2016/15/07 Revised: 2016/28/10 Accepted: 2016/8/11

1. Dept Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2. Zahedan Center of Infectious Diseases & Tropical, Zahedan, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(3):9-18

Abstract

Introduction:
Increasing use of disinfectants biocide cause to appearance of resistant strains of coagulase negative Staphylococcus. Some research confirmed this gene responsible for resistance to methicillin and association with these agents. The aim of this study was to investigate the presence of resistance genes of biocides such as qac A/B and smr in coagulase negative staphylococci.

Materials & Methods:
In this cross-sectional study, 60 samples of Staphylococcus epidermidis and 49 samples of Staphylococcus saprophyticus were collected over 9 months from clinical samples. After the initial biochemical tests and confirmation of genus and species of isolates, specific primers were used to study aqcA/B and smr genes through polymerase chain reaction (PCR). Data were analyzed using chi-square test.

Results:
Of 60 isolates of Staphylococcus saprophyticus, 36 isolates (60%) had mecA. Among these, 19 isolates (52.77%) had qacA and 21 isolates (58.33%) had smr. Furthermore, of 49 Staphylococcus epidermidis isolates, 27 isolates (55.1%) had mecA and among those isolates, 11 isolates (22.44%) had qac A/B and 8 isolate (16.32%) had smr.

Conclusions:
The results of our study showed the widespread presence of qac A/B and smr in clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. Given the low frequency of qacA/B and smr in the isolates sensitive to the antibiotics, it is necessary to evaluate antibiotic resistance for treatment of microbial infections.

Keywords: Drug Resistance, Methicillin-Resistant Staphylococcus, qacA/B

* Corresponding author, Email: h.tahmasebi87@yahoo.com