

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

نویسندگان:

حامد طهماسبی<sup>۱\*</sup>، محمد بکائیان<sup>۲</sup>، جواد ادبی<sup>۱</sup>

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز بیماری های 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 آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام یکی از شایع ترین موارد مقاومت در استافیلوکوک ها است. این امر در پاتوژن های بیمارستانی از جمله استافیلوکوک های کواگولاز منفی به فراوانی دیده می شود. از این رو شناسایی عوامل مقاوم می تواند در امر درمان کمک کننده باشد. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت بتالاکتامی در استافیلوکوک های کواگولاز منفی با روش های فنوتیپی و ژنو تیپی است.

**روش کار:** در مجموع ۷۱۰ جدایه از نمونه های بالینی مراکز درمانی شهر زاهدان جمع آوری شدند. بعد از تعیین جنس و گونه کردن نمونه های به دست آمده حساسیت آن ها نسبت به ده آنتی بیوتیک بتالاکتام با روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. برای ردیابی ژن های *blaZ* و *mecA* از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR استفاده شد.

**یافته ها:** از جدایه های به دست آمده، ۷۹ جدایه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و ۱۹۸ جدایه استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند. از این میان ۷۴ جدایه (۹۸،۱٪) به پنی سیلین، 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 ژن های *mecA* و *blaZ* را در بیش تر جدایه ها تأیید کرد.

**نتیجه گیری:** با توجه به فراوانی ژن های *mecA* و *blaZ* و نتایج آزمون های فنوتیپی در بین استافیلوکوک های کواگولاز منفی، زمینه ظهور شیوع سوبه های مقاوم به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی در حال افزایش است.

**واژگان کلیدی:** کواگولاز منفی، بتالاکتام، مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت به متی سیلین

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

## مقدمه:

عفونت های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند [۴]. از جمله مهم ترین استافیلوکوک های کواگولاز منفی، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس هستند [۵]. این باکتری ها که سال ها به عنوان ساپروفیت محسوب می شدند، در دهه های اخیر به دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، نظیر سوندها، کاترها و پروتژها به عوامل مهاجم و بیماری زا مبدل شده اند [۶]. همین امر باعث شده است که این گروه از باکتری ها، به خصوص دو گونه نام برده، جز باکتری های عفونی کننده بیمارستانی طبقه بندی شوند [۷]. در بیش تر مواقع برای درمان

استافیلوکوک های کواگولاز منفی (CoNs) یکی از مهم ترین پاتوژن ها در ایجاد عفونت های ناشی از به کارگیری کاتترهای بیمارستانی است [۱]. این باکتری ها دارای ویژگی های چسبندگی خاصی هستند که این امر باعث تمایل ارگانیسم به اتصال و کلونیزه شدن در ابزارهای مصنوعی می شود [۲]. این گروه که به صورت فلورنرمال روی پوست انسان زندگی می کنند، در صورت فراهم شدن شرایط، شکل بیماری زا به خود گرفته و سبب بروز عفونت می شوند [۳]. کواگولاز منفی ها مسئول بروز عفونت های گسترده ای در انسان و دام است و می توانند سبب انتشار

\* نویسنده مسئول، نشانی: زاهدان، میدان خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی شناسی

پست الکترونیک: h.tahmasebi87@yahoo.com

تلفن تماس: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵

پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۳۱

اصلاح: ۱۳۹۵/۲/۱۳

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳۰

## روش کار:

در این مطالعه توصیفی-مقطعی که در بازه زمانی دی ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۷۱۰ نمونه بالینی کوآگولاز 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، کوآگولاز، تخمیر مانیتول، DNase، مشخص شدند (محیط‌ها: Sigma آمریکا). برای شناسایی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از استافیلوکوک اپیدرمیدیس، علاوه بر استفاده از دیسک‌های نوویوسین 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 بی‌هوایی، 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 نوویوسین، باسیتراسین و پلی میکسین B استافیلوکوک‌های اپیدرمیدیس از ساپروفیتیکوس جدا شدند. برای شناسایی استافیلوکوک هومینیس از اپیدرمیدیس نیز از آنتی‌بیوتیک‌های فسفوماپسین و دیسفریوکسامین استفاده شد. استافیلوکوک‌ها اپیدرمیدیس در نظر گرفته شدند. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آخرین نسخه موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند. برای کلیه آزمون‌ها از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰ میکروگرم، سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم، اوگزاسیلین ۱ 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

اغلب عفونت‌های با منشأ استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی از داروهای گروه بتالاکتام استفاده می‌شود که سهم نسل‌های جدید سفالوسپورین‌ها در این زمینه بیش‌تر است [۸]، اما به دلیل افزایش سریع بروز مقاومت به این گروه از داروها، درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانسیم با این گروه از داروها را با شکست مواجه کرده است [۹]. سازوکار اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در استافیلوکوک‌ها 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، سفالوسپورین‌ها و کرباپنم‌ها می‌شود [۱۱]. PBP2A و PBP4 انواع دیگری از PBP هستند که به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، به این پروتئین بیش‌تر پرداخته می‌شود [۱۲]. بتالاکتامازها به‌طور انتخابی، حلقه بتالاکتام را باز کرده به‌نحوی که ساختار تغییر یافته دارو نمی‌تواند اتصال مؤثری با PBP‌ها 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 متی‌سیلین و زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین 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 متی‌سیلین شده و موجب بروز مقاومت کاذب (منفی کاذب) به متی‌سیلین 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 کوآگولاز منفی علاوه بر انسان در حیوانات نیز مشاهده شده است. برخی از موارد انتقال آن‌ها از راه گوشت و شیر گزارش شده است [۱۶، ۱۷]. شناسایی این پاتوژن‌ها 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 استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی نسبت به داروهای گروه بتالاکتام و تعیین وجود ژن‌های mecA و blaZ بود.

میکروتیوب های درب دار پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن انجام شد.

پرایمرهای تهیه شده 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 سانتی گراد، رقت های استوک برای انجام آزمایش های بعدی در دمای ۲۰- نگهداری شدند. برای انجام PCR از DNA های استخراجی استفاده شد. در این فرایند از پرایمرهای زیر جهت تکثیر ژن blaZ در نمونه های موردنظر استفاده شد.

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

میکروتیوب های حاوی BHI جدایه های بالینی ذخیره شده در ۲۰- درجه سانتی گراد روی محیط بلاد آگارساب کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس چند کلنی از هر جدایه کشت داده شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی برات که قبلاً درون لوله های درب دار شیشه ایی به تعداد جدایه ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان موردنظر (۲۰ ساعت)، لوله ها از انکوباتور خارج شدند. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون

جدول ۱: فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای شناسایی ژن های blaZ و mecA

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

مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. تکثیر نهایی هم در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد 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 آگارز 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 طول موج 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) کپاژن ایران) عکس تهیه شد.

داده های به دست آمده به روش آمار توصیفی شامل تعیین فراوانی، درصد و میانگین به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از آزمون آماری کای مربع برای مقایسه یافته های کیفی و از آزمون تی مستقل برای مقایسه یافته های کمی استفاده شد. در این مطالعه مقدار  $p \leq 0.05$  از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

### یافته ها:

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 MgCl<sub>2</sub> (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل ( Tris-Hcl، PH8.5، (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>، 3mM Mgcl<sub>2</sub>، 0.2%Tween20 Insert red، unit Ampliqon polymeras 0/2، MmdNTP 4/4 dye and stabilizer) بود استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. سپس آزمون PCR برای ژن mecA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام گرفت. تکثیر نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه برای ژن blaZ و برای ژن mecA شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به

جدایه‌های مربوط به سوندهای ادراری (۳۶/۳۶٪ و ۲۰/۲۵٪) بودند (جدول ۲). نتایج مولکولی هم نشان دهنده شیوع به نسبت بالای ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌های کواگولاز منفی بود. به عبارت دیگر، 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 نشان دهنده افزایش چشمگیر سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های حامل ژن *blaZ* است.

بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که بیشترین میزان مقاومت در بین جدایه‌های به دست آمده 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 به دست آمده از کواگولاز منفی مربوط به جدایه‌های جدا شده از کشت ادرار (۴۹/۴۹٪ و ۵۵/۶۹٪) و بعد از آن

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

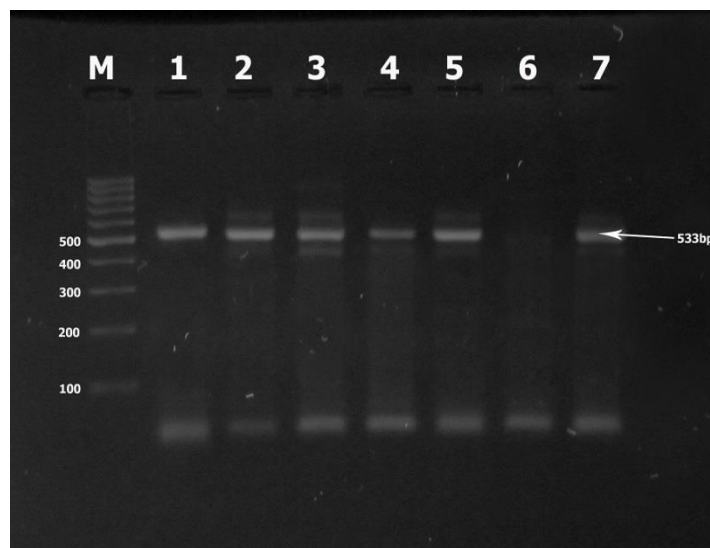
p-value (p≤0,05)	استافیلوکوک های کواگولاز منفی						آنتی‌بیوتیک
	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=۷۹)			استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=۱۹۸)			
	تعداد حساس (درصد)	تعداد نیمه حساس (درصد)	تعداد مقاوم (درصد)	تعداد حساس (درصد)	تعداد نیمه حساس (درصد)	تعداد مقاوم (درصد)	
۰,۲۴	۵۰	۵	۲۴	۱۱۴	۰	۸۴	سفتریاکسون
	۶۳,۲۵	۶,۹	۳۰,۳۷	۵۷,۵۷		۴۲,۴۲	
۰,۱۹	۳۸	۲۳	۱۸	۱۵۴	۱	۴۳	سفالکسین
	۴۸,۱۰	۲۹,۱۱	۲۲,۷۴	۷۷,۷۷	۰,۵۷	۲۱,۷۱	
۰,۳۳	۵۴	۵	۲۰	۱۴۳	۰	۵۵	سفسسیم
	۶۸,۳۵	۶,۳۸	۲۵,۳۱	۷۲,۲۲		۲۷,۷۷	
۰,۰۰۴۵	۵۷	۰	۲۲	۱۱۱	۰	۸۶	سفو کسیتین
	۷۲,۱۶		۲۷,۸۴	۵۶,۰۶		۴۳,۴۳	
۰,۰۳	۵۱	۲	۲۶	۱۱۰	۰	۸۵	پنی‌سیلین
	۶۴,۵۵	۲,۸	۳۲,۹۱	۵۵,۵۵		۴۲,۲۹	
۰,۰۴۵	۵۶	۰	۲۳	۱۱۲	۰	۸۴	اگزاسیلین
	۷۰,۸۸		۲۹,۱۱	۵۶,۵۶		۴۲,۴۲	
۰,۱۱	۴۵	۲۱	۱۳	۱۲۸	۹	۶۱	سیپروفلوکساسین
	۵۶,۹۶	۲۶,۵۸	۱۶,۴۵	۶۴,۶۴	۴,۵۲۳	۳۰,۸۱	

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

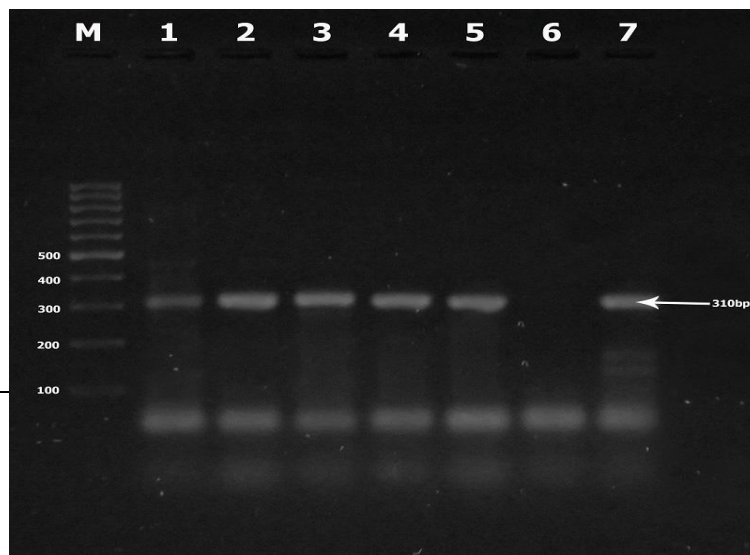
ژن	استافیلوکوک های کواگولاز منفی			
	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=۷۹)		استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=۱۹۸)	
	تعداد فاقد ژن (درصد)	تعداد دارای ژن (درصد)	تعداد فاقد ژن (درصد)	تعداد دارای ژن (درصد)
<i>mecA</i>	۵۶	۲۳	۱۰۲	۹۶
	۷۰/۸۸	۲۹/۱۱	۵۱/۵۱	۴۸/۹۷
<i>blaZ</i>	۳۲	۴۷	۴۹	۱۴۹
	۴۰/۵۰	۵۹/۴۹	۲۴/۷۴	۷۵/۲۵

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

استافیلوکوک های کواگولاز منفی (n=277)		
نوع نمونه	استافیلوکوک اپیدرمیدیس (n=198)	استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (n=79)
ترشحات زخم	۱۱	۱۷
	۶/۱۴	۲۱/۵۱
ادار	۹۸	۴۴
	۴۹/۴۹	۵۵/۶۹
سواپ	۱۷	۲
	۸/۵۸	۲/۵۳
سرسوند	۷۲	۱۶
	۳۶/۳۶	۲۰/۲۵



تصویر ۱: نتیجه ژل الکتروفورز ژن *mecA* در نمونه‌های بالینی استافیلوکوک کواگولاز منفی. چاهک M مارکر مولکولی مورد استفاده 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 مورد استفاده 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 تبدیل شده است. به طوری که 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 به دست آمده از مطالعه ژن ژو و همکاران در کشور انگلستان قابل مقایسه است [۱۴]. مقاومت به اوگزاسیلین و سفوکسیتین هم بعد از پنی سیلین از مقاوم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بودند که با مشاهدات فیسلر و همکاران در آلمان مشابهت دارد [۲۱]. نتایج حاصل از مطالعه نهایی و همکاران در ایران نشان دهنده متفاوت بودن طیف مقاومت به بتالاکتام‌ها 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 استافیلوکوک‌های 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 مورد بررسی بود که این نتایج با داده‌های به دست آمده 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 استافیلوکوک‌های ساپروفیتیکوس مقاوم به متی سیلین ۲۹/۱۱٪ و فراوانی استافیلوکوک‌های 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، نشان دهنده 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 به دست آمده 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 انجام شده در ایران روی مقاومت استافیلوکوک‌ها به داروهای بتالاکتام در بیش‌تر موارد بر پایه روش‌های فنوتیپی از جمله آزمون آنتی بیوگرام، تعیین حد اقل غلظت مهاری و تولید بتالاکتاماز است و مطالعاتی که به طور 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 این رو 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 استافیلوکوک‌های 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 استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی مقاوم به بتالاکتام‌ها دیده شد، می‌توان به این نتیجه رسید که روش‌های فنوتیپی به تنهایی 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

زاهدان به دلیل همکاری صمیمانه‌شان در به ثمر رسیدن این تحقیق تشکر می‌کنند.

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

### تعارض منافع:

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکردند.

### تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله از کارشناسان آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی و آزمایشگاه بیمارستان علی ابن ابی‌طالب

## References:

- 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.
- Siebert WT MN, Williams TW Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Southern Med J* 1978;71(11):67-79.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clinical Microbiol Rev* 2014;27(4):870-926.
- 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.
- Johannes Huebner M, Donald A, Goldmann M. Coagulase-Negative *Staphylococci*: Role as Pathogens. *Annual RevMedic* 1999;50(1):223-36.
- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-Negative *Staphylococci*: Pathogens Associated with Medical Progress. *Clinical Infect Dis* 1994;19(2):231-45.
- 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.
- 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 Univ Med Sci* 2015;17(2):93-104.
- 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.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(4):870-926.
- 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.
- 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.
- Raei F, Eftekhari F. Studying the presence of blaZ gene and  $\beta$ -lactamase production in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Iranian J Med Microbiol* 2008;2(2):35-41.
- 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.
- 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.
- Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol* 2009;134(2):73-81.
- 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.
- 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.
- Sidhu MS, Heir E, Leegaard T. Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with  $\beta$ -Lactamase Transposon Tn552 among Clinical *Staphylococci*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2002;46(9):2797-803.
- 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.
- 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.
- Kitao T. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from the fingers of nursing students. *J Infect Chemother* 2003;9(1):30-4.
- 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.
- Jarlov JO. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci typing and antibiotic

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



## Original Article

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

Tahmasebi Hamed\*<sup>1</sup>, Bokaeian Mohammad<sup>2</sup>, Adabi Javad<sup>1</sup>

Received: 12/21/2015

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