مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷، صفحات ۴۱- ۳۵

بررسی وجود ژن *blaZ* و تولید بتالاکتاماز در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

فرشته راعی ، فرشته افتخار*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی
نویسنده رابط: فرشته افتخار، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم زیستی ، دانشگاه شهید بهشتی
تلفن: ۲۹۹۰۳۲۰۸ فاکس: ۲۲۴۳۱۶۶۴ f-eftekhar@cc.sbu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله :۸ /۸/۸۷ تاریخ پذیرش مقاله :۸۷/۱۲/۲۶

چکیده:

مقدمه و اهداف: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به عنوان مهم ترین عضو گروه استافیلوکوک های کوآگولاز منفی، در دهه اخیر سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از متداول ترین عوامل عفونت خون مطرح گردیده است. برای درمان اغلب عفونت های ناشی از این باکتری از داروهای بتالاکتام استفاده می شود. ترشح آنزیم بتالاکتاماز نه تنها باعث ایجاد مقاومت به داروهای بتالاکتام می شود بلکه ترشح زیاد آن در برخی سویه های فاقد ژن مقاومت به متی سیلین، موجب مقاومت کاذب به متی سیلین می شود.

هدف از این پژوهش، تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به داروهای بتالاکتام، بررسی فنوتیپی حضور آنزیم بتالاکتاماز و در نهایت حضور ژن بتالاکتاماز (*blaZ*) در نمونه های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود.

روش بررسی: تعداد ۶۹ سویه استافیلوکوک کوآگولاز منفی از ۳ بیمارستان در شهر تهران جمع آوری شدند که از میان آنها ۵۵ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شناسایی شدند. حساسیت آنها نسبت به ۸ آنتی بیوتیک بتالاکتام با روش Disc diffusion تعیین شد. تولید آنزیم بتالاکتاماز توسط کلنی با تست یدومتری انجام شد و در نهایت حضور ژن *blaZ* با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی و روش PCR مطالعه شد.

یافته ها: نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی حاصل ازآزمایش آنتی بیوگرام نشان داد که ۵۴ ایزوله(۹۸/۱٪) به پنی سیلین، ۵۰ ایزوله (۹۰/۹٪)به متی سیلین، ۲۹ ایزوله (۵۲/۷٪) به سفتریاکسون، ۲۷ ایزوله (۴۹/۱٪) به سفتی زوکسیم، ۲۰ ایزوله (۳۶/۳٪) به سفوتاکسیم، ۱۹ ایزوله (۳۴/۵٪) به آموکسی سیلین، ۱۷ ایزوله (۳۰/۹ ٪) به سفازولین و۱۳ ایزوله (۲۳/۶٪)به سفالکسین مقاوم بودند. تست های یدومتری کلنی حضور بتالاکتاماز و نتایج حاصل از PCR نیز حضور ژن *blaZ* را در کلیه ایزوله ها تایید کرد.

نتیجه گیری: روش آنتی بیوگرام نشان داد که ۲۴٪ تا ۵۳ ٪ از ایزوله ها به انواع بتالاکتام های نسل سوم مقاوم هستند. حال آنکه روش یدومتری کلنی، تولید آنزیم بتالاکتاماز را در کلیه ایزوله ها و روش PCR حضورژن *blaZ* را در همه ایزوله ها نشان می دهد، اما میزان بیان آن متفاوت است. نتیجه گیری می شود که روش آنتی بیوگرام به تنهایی برای تعیین استراتژی درمانی عفونت های ناشی از این ارگانیسم مناسب نیست.

کلید واژه ها: بتالاکتاماز، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ،ژن *blaZ*

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه:

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مهم ترین عضو گروه استافیلوکوک های کوآگولاز منفی(CoNS) و عامل ۷۵٪ از عفونت های این گروه می باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکرو فلور طبیعی پوست انسان بوده و در مخاط بینی و بخش فوقانی مجاری تنفسی مستقر می باشد (۱). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تا مدت ها به خاطر طبیعت همه جایی و بیماریزایی نسبتاً ضعیف به عنوان ساپروفیت معرفی می شد. ولی در طی دهه های اخیر با گسترش استفاده از وسایل پزشکی تعبیه شونده در بدن (indwelling medical devices)، نظیر انواع سوندها، پروتزها، به عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی ظهور کرده است(۲). در دهه گذشته، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* سومین عامل عفونت بیمارستانی و یکی از شایع ترین عوامل عفونت خون مطرح شناخته شده است . همچنین به دفعات از عفونت های زخم، خون، مجاری ادرار، اندوکاردیت، باکتریمی، پنومونی، عفونت های پوستی و بافت نرم جدا شده است (۳).

برای درمان اغلب عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از داروهای بتالاکتام به خصوص نسل های جدید سفالوسپورین ها استفاده می شود. اما، افزایش سریع مقاومت به این داروها موجب ناموفق بودن درمان عفونت های وابسته به این ارگانیسم شده است. اصلی ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام در استافیلوکوک ها تولید آنزیم های بتالاکتاماز و یا تغییر پروتئین های دیواره (Penicillin Binding Proteins, PBPs) می باشد که تمایل کاهش یافته ای به دارو دارند و منجر به مقاومت وسیعی نسبت به پنی سیلین های نیمه سنتزی، سفالوسپورین ها و کرباپنم ها می شود. بتالاکتامازها به طور انتخابی، حلقه بتالاکتام را باز می کنند به نحوب که ساختار تغییریافته دارو نمی تواند اتصال موثری با PBP ها برقرار نماید. بنابراین سنتز دیواره سلولی ادامه می یابد (۴).

همبستگی بین مقاومت به پنی سیلین در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و تولید β-لاکتاماز اولین بار در سال ۱۹۴۴ گزارش شد. طبق آمار سویه های مقاوم باکتری از میزان ۵٪ در سال ۱۹۴۶، به ۵۰٪ در سال ۱۹۵۰ و به بیش از ۹۰٪ در حال حاضر رسیده است (۵).

از آنجایی که نواحی رمز کننده ۴ نوع بتالاکتاماز استافیلوکوکی همپوشانی دارند، تنها با روش های سرولوژیکی و تفاوت در هیدرولیز سوبسترا می توان نوع بتالاکتاماز را در باکتری تشخیص داد . روش های فنوتیپی تولید آنزیم بتالاکتاماز، نظیر روش های یدومتری، اسیدومتری و سفالوسپورین های رنگ زا(نیتروسفین) فقط حضور این آنزیم را گزارش می کنند (۴).

ترشح آنزیم های بتالاکتاماز نه تنها باعث ایجاد مقاومت باکتری در برابر داروهای بتالاکتام می شود، بلکه ترشح زیاد آن در برخی سویه های فاقد ژن مقاومت به متی سیلین، موجب مقاومت کاذب به متی سیلین می شود (۶).

هدف از انجام این پژوهش، تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نسبت به داروهای بتالاکتام، تعیین فنوتیپی حضور آنزیم بتالاکتاماز و در نهایت تعیین وجود ژن بتالاکتاماز (*blaZ*) بود.

مواد و روش ها:

جمع آوری و شناسایی نمونه ها:

تعداد ۶۹ نمونه بالینی CoNS از بیمارستان های طالقانی، امام حسین و بوعلی در شهر تهران جمع آوری شدند. نمونه ها شامل ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه، سر سوند و GV line (رگ تغذیه کننده قلب) بودند. در آزمایشگاه ایزوله های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی استاندارد نظیر کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول، DNaz، مقاومت به باسیتراسین و حساسیت به نوبیوسین شناسایی شدند. برای کلیه تست ها از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل استفاده شد.

تست آنتی بیوگرام:

تعیین حساسیت ایزوله های بالینی به ۸ آنتی بیوتیک بتالاکتام شامل پنی سیلین، متی سیلین، اموکسی سیلین، سفتریاکسون، سفتی زوکسیم، سفوتاکسیم، سفازولین و سفاکسین (شرکت پادتن طب ایران) با استفاده از روش Kirby-Bauer، انجام شد. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل ۰/۵مک فارلند در محیط مایع مولر-هینتون تهیه و به وسیله سواب استریل روی سطح آگارمولر-هینتون تلقیح می گردید. سپس دیسک ها با فواصل مناسب روی سطح پلیت قرار داده می شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۵ °C، قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری می گردید (۷) .

Archive of SID

www.SID.ir

تست یدومتری کلنی:

تولید آنزیم بتالاکتاماز با تست یدومتری کلنی برای تمام ایزوله ها انجام شد. کاغذهای حاوی نشاسته به ابعاد ۲×۵ سانتی متر بریده شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول حاوی ۰/۱ گرم پنی سیلین G در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم M ۰/۱ خیسانده می شدند. سپس به وسیله لوپ استریل، کلنی های ایزوله از کشت های یک شبه باکتری به سطح کاغذ منتقل و پس از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای $37\ ^{o}C$، محلول ید گرم به کاغذها اضافه گردید. ایجاد هاله سفید در اطراف کلنی نشانه تولید آنزیم بتالاکتاماز بود. این هاله ها در نتیجه تخریب حلقه بتالاکتام توسیله آنزیم و ایجاد پنی سیلانیک اسید به وجود می آیند که کمپلکس بنفش رنگ نشاسته-ید در اطراف کلنی را بی رنگ می کند[۹].

استخراج DNA و آزمایش PCR:

استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط آگارمغذی در $37\ ^{o}C$ استفاده شد. سپس یک لوپ کامل از کشت باکتری به یک لوله اپندورف محتوی ۲۵۰µl آب مقطر استریل انتقال و پس از ۲۰ دقیقه گرماگذاری در حمام آب جوش، به مدت ۵ دقیقه و با سرعت x ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. از مایع رویی حاوی DNA به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد (۹و ۱۰).

تست PCR برای تشخیص حضورژن مقاومت به بتالاکتاماز (*blaZ*) انجام شد. جداول ۱و۲ برنامه به کار گرفته شده در دستگاه ترموسایکلر و مخلوط واکنش ها را نشان می دهند. پرایمرهای Forwardو Reverse که برای آمپلیفیکاسیون ژن بتالاکتاماز استفاده شدند به ترتیب ترادف های ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC و TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC بودند. برای مشاهده محصول PCR ، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. تعیین سایز محصول با استفاده از مارکر 100 bp ladder (Fermentas) صورت گرفت (۱۱). طول محصول تکثیر شده با این جفت پرایمر، ۱۷۰ bp بود.

جدول ۱: برنامه دمایی و زمانی PCR

مراحل	دما (^{o}C)	زمان (دقیقه)
Initial-Denaturation	۹٤	۲
Denaturation	۹٤	۱
Annealing	۵۵	۱
Extension	۷۲	۲
Final-Extension	۷۲	۵
Cycle Count	۳۰	

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: غلظت های مخلوط PCR

غلظت	مواد
mM۱/۵	$MgCl_2$
unit۱	Taq polymerase
pM۲۰	(mix R+F) Primer
X۱	Reaction Buffer
M۲۰۰	dNTP (mix)
۱۰	DNA- template

نتایج:

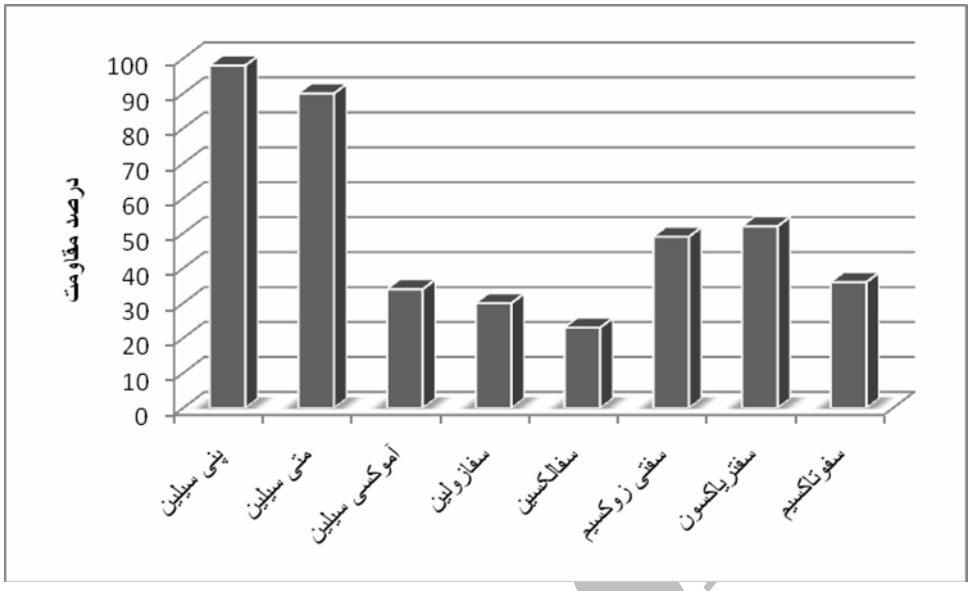
سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به دست آمده* از بیمارستان های طالقانی ، بوعلی و امام حسین به ترتیب ٪۹۲/۵ ، ٪ ۱۰۰ و ٪ ۶۲/۵ از نمونه های CoNS دریافتی بودند. در مجموع ۵۵ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جمع آوری شد که اغلب آنها از عفونت های خون و ادرار به دست آمده بودند.نتایج حاصل از تست های آنتی بیوگرام نشان داد که ۵۴ سویه (٪۹۸/۱) به پنی سیلین،۵۰ نمونه(٪۹۰/۹)به متی سیلین، ۲۹ نمونه(٪۵۲/۷) به سفتریاکسون،۲۷ نمونه(٪۴۹/۱)به سفتی زوکسیم،۲۰ نمونه(٪۳۶/۳) به سفوتاکسیم،۱۹ نمونه(٪۳۴/۵) به آموکسی سیلین،۱۷ نمونه(٪۳۰/۹) به سفازولین و۱۳ نمونه(٪۲۳/۶)به سفالکسین مقاومت نشان دادند. به طور کلی، حدود ٪۲۴ تا ٪۵۳ از ایزوله ها به انواع بتالاکتام های نسل سوم مقاوم بودند (نمودار۱).

تست فنوتیپی یا ومتری کلنی، حضور بتالاکتاماز را در کلیه سویه ها نشان داد. هر چند، اندازه هاله های سفید اطراف کلنی ها متفاوت بود که نشان می دهد میزان تولید آنزیم در سویه های مختلف متفاوت است. نتایج نشان داد که ایزوله ها حساس به پنی سیلین و متی سیلین نیز آنزیم را هرچند به طور ضعیف تولید کردند.

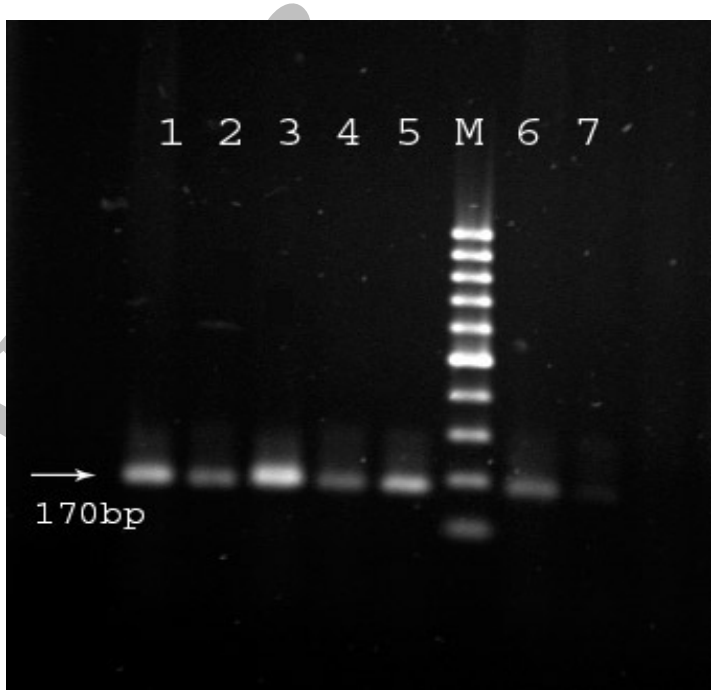
واکنش PCR برای بررسی حضور ژن *blaZ*، حضور ژن را در کلیه ایزوله ها تایید کرد.این نتایج با نتایج تست تولید بتالاکتاماز به وسیله کلنی همخوانی داشت. شکل ۱ اندازه محصول حاصل از تکثیر ژن *blaZ* در روش PCR را نشان می دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۱: الگوی مقاومت ایزوله های *S. epidermidis* به آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام



شکل۱: الکتروفورز ژل آگارز. محصول آمپلیفیکاسیون ژن *blaZ* (۱۷۰bp) در ۷ نمونه بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*.

M: مارکر.

www.SID.ir

بحث:

شیوع استافیلوکوک ها در عفونت های بیمارستانی در سراسر جهان گسترش زیادی پیدا کرده است. بررسی های آماری در اغلب کشور های جهان نشان داده اند که *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* غالب ترین عامل شایع عفونت های خون و از عوامل شایع عفونت های دستگاه ادراری می باشد(۱۲). نتایج این پژوهش نیز هر چند در تعداد محدودی انجام گرفته است، با این آمار همخوانی دارد.

درصد مقاومت به پنی سیلین های حساس به بتالاکتاماز استافیلوکوکی در میان ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۹۰-۸۰ ٪ و گاهی تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (۱۳). پژوهش حاضر نیز در ۹۸/۱ ٪ مقاومت به پنی سیلین را نشان داد.

در سال۲۰۰۷ بیان شد که ممکن است [illegible] پایین منجر به عدم تولید بتالاکتاماز در استافیلوکوک ها با روش دیسک دیفوزیون سفینار شناسایی نشود و در این موارد بهتر است از تست یدومتری استفاده شود (۱۳).

دانش منفرد در سال ۱۳۸۲، تولید آنزیم بتالاکتاماز را در ایزوله های بالینی استافیلوکوک کوآگولاز منفی با روش یدومتری و دیسک نیتروسفین بیش از ۹۰٪ گزارش کرد(۱۴). در مطالعه حاضر ۱۰٪ ایزوله ها مولد بتالاکتاماز و حامل ژن *blaZ* بودند. هر چند، تست کلنی میزان بیان متفاوت ژن را در سویه های مختلف نشان داد. این یافته با نتیجه آنتی بیوگرام همخوانی نشان نمی دهد. این اختلاف اغلب به علت حساسیت کاذب و غیر واقعی در سویه های مقاوم به متی سیلین می باشد. در بسیاری از موارد روش آنتی بیوگرام برای تعیین استراتژی درمانی این عفونت ها مناسب نیست وبنابر توصیه CLSI، تنها استفاده از پنی سیلین و اگساسیلین برای بررسی حساسیت استافیلوکوک ها به داروهای بتالاکتام کافی است (۷).

پژوهش های انجام شده در ایران بر روی مقاومت استافیلوکوک ها به داروهای بتالاکتام، اکثراً بر پایه روش های فنوتیپی مانند آنتی بیوگرام، MIC و تولید بتالاکتاماز می باشد و مطالعاتی که به طور اختصاصی بر روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس باشد، محدود است.

صادقیان و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، با استفاده از پرایمرهای TEM-1 در میان استافیلوکوک های کوآگولاز منفی و مثبت، ۲۶٪ مقاومت را گزارش کردند. پایین بودن این مقاومت احتمالاً به علت استفاده از پرایمرهایی بوده که برای استافیلوکوک ها کمتر اختصاصی است (۱۵).

نتیجه گیری :

تولید بتالاکتاماز یک خطر جدی برای درمان عفونت هایی است که مشکوک به ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتاماز هستند. انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای تعیین استراتژی درمانی این عفونت هااغلب بر پایه انجام آزمایش های آنتی بیوگرام عملی نیست و [illegible] دیگری لازم به نظر می رسند. استفاده از تست یدومتری [illegible] آزمایشات PCR برای تشخیص تولید بتالاکتاماز با توجه به ساده [illegible] بودن روش و اینکه به زمان زیادی احتیاج ندارد، ممکن است [illegible] در تشخیص تولید کننده های بتالاکتاماز در ایزوله های بالینی مفید واقع شود.

فهرست مراجع:

1. Jawetz E, Melnic[illegible]GL, Ad[illegible]berg EA. In :Medical Microbiology. 24[illegible] Mc Graw Hill Inc. Columbus, OH, USA. 2007; 224-230.
2. Mathur T, Singha[illegible] S, Khan S, Upadhyay DJ, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006; **24**(1): 25-26.
3. Dieckema DJ, Pfaller M., Schmitz FJ, Smeyevsky J, Jones RN. Survey of infections due to susceptibility of isolates collected in the Unites States, Canada, Latin America, Europe and the Western region for the SENTRY pacific antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect*. 2001; Dis.32:S114-S132.
4. 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.
5. Lyon BR , Skurray RA. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev*. 1987; **51**: 88-134.
6. Niemeyer DM, Pucci MJ, Sharma VK, Archer GL. Role of mecA transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus. J Bacteriol*. 1996; **178**(18): 5464-5471.
7. National Committee for Clinical aboratory Standards, NCCLS. Performance Standards For antimicrobial Susceptibility Testing, 15th information supplement (M100-S15).Wayne, Pa. 2005.

Archive of SID

www.SID.ir

8. Llanes R, Gonzalez M , Martinez I, Sosa J, Guzman D, Gutierrez O, Llop A, Sanches L. Evaluation of four methods for detecting the beta- lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; **98**(8): 1089-1091
9. Rohde H, Kalitzky M, Kroger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knoblock JKM, Zander AR, Mack O. Detection of virulence – associated genes and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from bonemarrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 5614-5619.
10. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iran Biomed J.* 2007; **11**(3):161-167.
11. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Trial E, Bergeron MG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J Antimicrob Chemother*. 2000; **46**, 527-533.
12. Marshal SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* . 1998; **30**:205-214.
13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. In: Bailey & Scott ' diagnostic microbiology. 12th edition, Mosby Inc, USA. 2007; 607-618.
۱٤. دانش منفرد سمیه، افتخار فرشته. بررسی الگوی مقاومت استافیلوکوکها به داروهای بتالاکتام با استفاده از دیسک های پنی سیلین و اکساسیلین. مجله بیماری های عفونی و گرمسیری۱۳۸۲، شماره ۲۳، ص٦- ۱
15. Sadegh[illegible] S, Neyestani TR, Burnie JP. Detection of bacterial, methicillin resistance a[illegible]ta-lactamase genes found in wound swabs by multiplex polymerase chain reaction. *Acta Medica Iranica.* 2004; **42**(1): 19-25.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir