

فراوانی و مقاومت گونه‌های مختلف استافیلولوکوک و شناسائی سویه‌های مولد بتلاکتماز با روش کاغذی سریع نشاسته

مژده حاکمی والا^۱، پرویز کواكب^۲، فاطمه باقری بجستانی^۳، گلناز فاضل نجف آبادی^۴

۱. میکروب شناس، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲. دکتری انگل شناسی، کارشناس آزمایشگاه بیمارستان سینا دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳. مریم گروه میکروب شناسی واحد علوم دارویی آزاد اسلامی

۴. دکتری حرفه‌ای داروسازی

* نشانی برای مکاتبه: ولنجک، بلوار داشجو، خ کودکیار، دانشکده پزشکی، ط هفتم گروه میکروب شناسی تلفن ۰۳۸۷۷۵۵۶

mojdeh_hakemi@yahoo.com

پذیرش برای چاپ: آبان هشتاد و نه دریافت مقاله: شهریور هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل اهمیت عفونت‌های بیمارستانی و نقش استافیلولوکوکها در ایجاد این عفونت‌ها هر ساله مطالعاتی در زمینه عفونتهای بیمارستانی و تعیین علل مقاومت این باکتریها به انواع مختلف انتی‌بیوتیک‌ها رایج، همچنین اثر آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر و پاسخ‌دهی آنها به عفونت‌های بیمارستانی صورت می‌گیرد. این مطالعه برای ارزیابی فراوانی عفونت‌های بیمارستانی بعلت گونه‌های مختلف استافیلولوکوکها و میزان مقاومت اینها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و تعیین سویه‌های رایج و تعیین مولد بتلاکتماز در بیمارستان سینای تهران انجام گرفت.

روش کار: از تیرماه ۸۶ تا ابتدای فروردین ۱۷، بمدت ۹ ماه ۱۰۰ سویه استافیلولوکوک از نمونه‌های مختلف کلینیکی جدا شد. مقاومت ریح‌سازیت سویه‌های جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسیسیلین، جنتامیسین، سفالوتین، ونکوماپسین، کلوگزاسیلین و سفازولین در سویه‌های کواگولاز منفی و مثبت با روش دیسک دیفیوژن و بر اساس متد Kirby_Bauer انجام شد. بعلاوه توانایی تولید آنزیم بتلاکتماز بعنوان یکی از راههای مقاومت در برابر داروهای بتلاکتم در این تحقیق با استفاده از روش سریع نوار کاغذی نشاسته تعیین شد.

یافته‌ها: فراوانی گونه‌های مختلف استافیلولوکوک به ترتیب شامل: استافیلولوکوک اورئوس ۳۶٪، استافیلولوکوک ساپروفیتیکوس ۱۹٪، استافیلولوکوک اپیدرمیدیس ۱۶٪ و سایر گونه‌های کواگولاز منفی ۲٪ بوده و بیشترین مقاومت سویه‌های کواگولاز مثبت و در سویه‌های کواگولاز منفی نسبت به آموکسیسیلین و به ترتیب معادل ۹۳٪ و ۶۲٪ بوده است. بعلاوه بطور کلی ۷۳٪ از سویه‌های کواگولاز مثبت و منفی مولد این آنزیم بوده اند.

نتیجه گیری: با توجه به میزان بالای تولید بتلاکتماز در بین سویه‌های کواگولاز منفی و مثبت (۷۳٪) بررسی شده در این مطالعه، بیشترین مکانیسم مقاومت سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق نسبت به داروهای بتلاکتم، بدلیل تولید بتلاکتماز می‌باشد.

واژگان کلیدی: استافیلولوکوکوس، اورئوس، کواگولاز منفی، عفونت‌های بیمارستانی، مقاومت،

مدت بستری شدن بیماران در بیمارستان از ۱ تا ۳ روز افزایش یافته و این در حالی بوده که بیماران دیگری به دلیل نبودن تخت خالی جان سپردند. میزان ابتلا به این نوع عفونتها در بخش نورولوژی ۱٪ تا ۶۱/۵٪ در بخش سوختگی متغیر بوده است (۲ و ۳ Carmen). و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ مطالعه ای انجام داده و مشخص کردند از بیماران بستری در بیمارستانها حدود ۳-۵٪ به عفونتهای بیمارستانی مبتلا می‌شوند (۴).

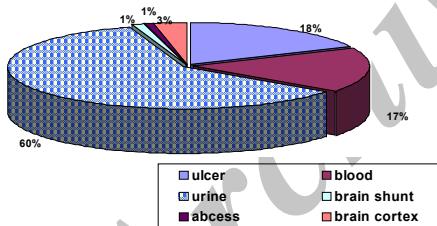
مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی یکی از معضلات قرن حاضر می‌باشد. طی سالیان گذشته همزمان با پیشرفت علوم مختلف پزشکی و بکار گیری روش‌های پیچیده که از یک سو باعث نجات جان انسان ها شده، از سوی دیگر به دلیل تهاجمی برخی از این روش‌ها آسودگی با عفونت‌های مقاوم به دارو ایجاد شده که در برخی موارد به مرگ منجر شده است (۱). همچنین طول

ونکومایسین(μg) 30 ، کلوجراسیلین(μg) 5 ، سفارازولین(μg) 30 بر اساس پروتکل Kirby-Bauer انجام شد(^{۱۰}). سویه‌های مقاوم به دارو های بتالاتام و سفالوسپورین های، سویه‌های کاندید برسی از نظر تولید بتا لاكتاماز بودند. بدین منظور از روش سریع نواری نشاسته استفاده شد. در این تست در صورت تولید آنزیم بتالاتاماز پنی سیلین شکسته و اسید پنی سیلیوئیک ایجاد می‌گردد که در اینصورت به نشاسته متصل شده و با ید واکنش رنگی ایجاد نمی‌کند. در صورتیکه باکتری مولد آنزیم نباشد نشاسته آزاد مانده و با ید واکنش رنگی ایجاد می‌کند(^{۱۱}).

یافته‌ها

نمونه‌های مختلفی از بیماران بستری در بیمارستان سینای تهران که در طی اقامت در این بیمارستان به عفونتهای مختلفی دچار شده بودند به آزمایشگاه ارسال تا از نظر وجود گونه‌های مختلف استافیلولوکوك مورد بررسی قرار گیرند. بدین منظور کلیه نمونه هادر شرایط استریل جمع آوری شده و روی محیط خوندار کشت داده شدند. در ادامه سایر تستهای تائیدی و افتراقی استاندارد باکتریولوژی برای کلونی های جدا شده انجام گرفت. کلیه باکتری هایی که بصورت کوکسی های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، با توانایی رشد در محیط مانیتول سالت آگار بعنوان جنس استافیلولوکوك تائید شدندو در ادامه با انجام تست کواگلار نمونه به دو دسته کواگلار مثبت و منفی تقسیم شدند. گونه های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس با استفاده از دیسک نوبویوسین به ترتیب بصورت حساس و مقاوم افتراق یافتند. فراوانی نمونه های ارسالی بر اساس نقاط مختلف نمونه برداری در نمودار ۱ مشخص شده است. بعلاوه از نمونه ها از مردان و ۶۷% از زنان ۳۷% آنها از نمونه جدا شد. ۶۳% نمونه ها استافیلولوکوس آرئوس، ۱۹% استافیلولوکوس ساپروفیتیکوس، ۱۶% استافیلولوکوس اپیدرمیدیس بودند. 2% نمونه ها به گونه های کواگلار منفی دیگر تعلق داشتند.



نمودار ۱: فراوانی نمونه های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سینا

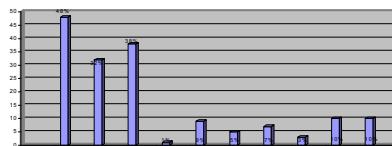
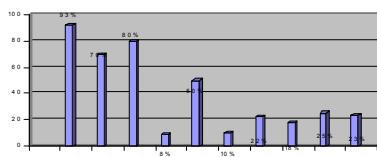
حساسیت و یا مقاومت سویه های مختلف استافیلولوکوك مورد بررسی در این مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های مورد بررسی در دو گروه سویه های کواگلار مثبت و منفی در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آموکسی سیلین 93% و پس از آن نسبت به اریتروماسین 80% در سویه های کواگلار مثبت وجود داشت در حالیکه میزان مقاومت سویه های کواگلار منفی نسبت به همین آنتی بیوتیکها کمتر و به ترتیب 48% و 38% بوده است. از بین باکتری های کواگلار مثبت و به ترتیب 63% و از بین سویه های کواگلار منفی 27% با روش غربالگری سریع نواری نشاسته بعنوان مولد بتالاتاماز شناسائی شدند. بدون درنظر گرفتن کواگلار 73% سویه های استافیلولوکوك جدا شده مولد بتالاتاماز بودند.

از جمله مهمترین باکتری های مولد عفونتی های بیمارستانی می‌توان به اشیشیا کلی، کلبسیلا، استافیلولوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، سودو موناس اثروزینوزا و انتروکوک ها اشاره نمود(^۵). استافیلولوکوها؛ کوکسی های گرم مثبتی بوده که معمولاً بصورت خوشه های انگوری بطور منظم کنار هم قرار می‌گیرند و در بسیاری از مواد ضد میکروبی سریعاً مقاوم شده و مشکلات درمانی عدیده ای را پدید آورده اند. استافیلولوکوک های کواگلار منفی جزئی از فلور طبیعی انسان بوده ولی در افراد مسن، اطفال، بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و یا افرادی که دارای کاتری با پروتز مصنوعی هستند براحتی بیماری ایجاد می‌کنند. حدود 75% از عفونتهای ناشی از استافیلولوکوک های کواگلار منفی به دلیل آلدگی با استافیلولوکوس اپیدرمیدیس رخ میدهد. این باکتری ها از علل شایع عفونت های ادراری بالوان جوان می‌باشند. سویه های استافیلولوکوس اورئوس علت تقریباً 25% از عفونتهای بیمارستانی هم در بیماران جراحی شده و هم سایر بیماران می‌باشد(^۶). این باکتری ها نیز مانند بسیاری از دیگر باکتری ها نسبت به انتی بیوتیکهای رایج مقاومت کسب نموده اند و خصوصاً سویه های مقاوم به متی سیلین به دلیل انتشار گستره و نقش مهمشان در ایجاد عفونتهای بیمارستانی مورد توجه همگان می‌باشند(^۷). AKO و همکاران در سال 2005 می‌باشند که کواگلار منفی بیوتیکها را در بین گونه های مختلف استافیلولوکوک های کواگلار منفی و مثبت شده از کودکان و نوزادان بستری در نیجریه تعیین کرد و مشخص نمودند، 68% از گونه های استافیلولوکوس اورئوس جدا شده به آموکسی سیلین، 69% به کلوجراسیلین و 71% به تتراسایکلین مقاومت داشته اند و از این بین 54% مولد بتا لاكتاماز بودند(^۸).

از آنجاییکه هر گونه تصمیم گیری و تغییر در برنامه های کنترل عفونت نیازمند اطلاعات جامع و صحیح از وضعیت موجود در ایران می‌باشد، بر آن شدید تا در این تحقیق با تعیین فراوانی سویه های استافیلولوکوک جدا شده از عفونتهای مختلف بیمارستانی و تعیین مقاومت آنها نسبت به داروهای رایج و در نهایت تعیین فراوانی سویه های مولد بتا لاكتاماز در بین گونه های مختلف استافیلولوکوک جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سینای تهران به اطلاعات جدیدی دست یابیم که بتواند در برنامه ریزی بهداشتی کشوری موثرآقع گردد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی از بیمارانی که در زمان ورود به بیمارستان فاقد عفونت بوده و در طول بستری شدن دچار عفونت شده بودند نمونه برداری از نقاط مختلف انجام شد. در ادامه تست های آنتی بیوگرام و تولید بتا لاكتاماز انجام و نتایج حاصله ثبت گردید: نمونه برداری طی 9 ماه از تیرماه 1386 تا 1387 از بیماران بستری در بیمارستان سینای تهران انجام شد. در همان روزه 24 ساعت در گرمخانه سانتی گراد خوندار کشت داده شد و بمدت 24 ساعت در 37°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ادامه با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار باکتری های جدا شده از نظر جنس استافیلولوکوک تأیید شدند. افتراق گونه های استافیلولوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس با استفاده از تست کواگلار و تعیین حساسیت سویه های جدا شده نسبت به دیسک نوبویوسین انجام شد(^۹ و ^{۱۰}). مقاومت یا حساسیت سویه های جدا شده نسبت به دیسکهای آنتی بیوتیک زیر شامل آموکسی سیلین (μg) 25 ، تتراسایکلین (μg) 30 ، اریتروماسین (μg) 15 ، کلامفینیکل (μg) 30 ، کوتربیموکسازول (μg) 25 ، جنتامیسین (μg) 10 ، سفالوتین (μg) 30 ،



نمونه ۲: مقاومت سویه های استاتیلولوک جدا شده از بیماران بسته در بیمارستان سینا نسبت به آنتی بیوتیکهای بررسی شده (A) سویه های کواگولاز منفی (B) سویه های کواگولاز مثبت

های جدا شده مریبوط به استافیلولوکوس اورئوس معادل $\% ۶۹/۸$ و $\% ۳۰/۲$ مربوط به گونه های کواگولاز منفی بوده است. در مطالعه حاضر نیز بطور مشابه بیشترین نمونه مورد بررسی مریبوط به نمونه های ادرار $\% ۶۰$ و پس از آن ترشحات زخم $\% ۱۸$ و خون $\% ۱۷$ بوده است. همچنین بیشترین گونه جدا شده مریبوط به استافیلولوکوس اورئوس معادل $\% ۵۳$ و $\% ۳۷$ مربوط به باکتری های کواگولاز منفی بوده است. مقاومت سویه های مقاوم به متی سیلین کواگولاز مثبت و سویه ای مقاوم به متی سیلین ولی کواگولاز منفی نسبت به پنی سیلین به ترتیب 100% و $\% ۹۳$ نسبت به اریتروماسیسین $\% ۸۳$ و $\% ۷۶$ و نسبت به کلوگراسیلین در هر دو دسته 100% بوده است. همچنین هر دو دسته به ونکومایسین 100% حساسیت نشان دادند(۱۳). در مطالعه پیش رو نیز گرچه مقاومت نسبت به متی سیلین بررسی نشده است ولی بطور مشابه بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در هر دو دسته کواگولاز مثبت و منفی به ترتیب مریبوط به آموکسی سیلین $\% ۹۳$ و $\% ۴۸$ ، نسبت به اریتروماسیسین $\% ۸۰$ و $\% ۳۸$ بوده است. مقاومت به کلوگراسیلین در مطالعه پیش رو برخلاف مطالعه مورد بررسی در هر دو دسته کواگولاز مثبت و منفی $\% ۲۳$ و $\% ۱۰$ به ترتیب) نسبت به نتایج حاصل از مطالعه فوق 100% در هر دو دسته کواگولاز مثبت و منفی پائین تر می باشد. همچنین بطور مشابه حساسیت به ونکومایسین نیز در هر دو دسته باکتری های کواگولاز مثبت و منفی همچون مطالعه فوق گرچه 100% نمی باشد و لی بر حد بالاتری معادل $\% ۸۲$ در سویه های کواگولاز مثبت و $\% ۷۷$ در بین سویه های کواگولاز منفی است و با نتایج محققین مطالعه فوق مطابقت دارد.

در مطالعه دیگری که در مصر انجام شد از 470 نمونه بالینی 187 سویه بعنوان سویه های استافیلولوک شناسایی شدند. از این تعداد 132 مورد مربوط به استافیلولوک اورئوس و 55 مورد مریبوط به سوی های استافیلولوک کواگولاز منفی بوده است. مقاومت سویه ها نسبت به ونکومایسین $1/۱۵$ و $۱/۲۳$ امیکاسین $1/۱۵$ بوده است. تولید بتالاکتاماز در $\% ۶۱/۷$ از سویه های استافیلولوک اورئوس و $\% ۴۲/۹$ از سویه های کواگولاز منفی مقاوم به آمپی سیلین مشاهده گردید. در ادامه این محققین الگوی پلاسمیدی را نیز بررسی کرده و انواعی از پلاسمید ها با وزن مولکولی مختلف را شناسایی نمودند(۱۴). در مطالعه حاضر گرچه الگوی پلاسمیدی تعیین نشده است ولی بطور مشابه بیشترین میزان تولید بتالاکتاماز در سویه های کواگولاز مثبت ($1/۶۳$) داده شده است. گرچه که $\% ۳۷$ از سوی های کواگولاز منفی در این مطالعه در مقایسه با $۴۲/۹\%$ مولد بتالاکتاماز بوده اند و این تفاوت می تواند به تفاوت وضعیت بهداشت و الگوی مصرف دارو در مصر و ایران مرتبط باشد.

بحث

در این مطالعه بمدت ۹ ماه (از تیر ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷) نمونه برداری از بیمارانی که به دلایل مختلف در بیمارستان سینای تهران بستری شده و در طول بستره شدن به عفونت مبتلا شده بودند انجام گرفت و ۱۰۰ نمونه بالینی بطور تصادفی انتخاب شد. نمونه ها بر حسب هدف تحقیق که جدا سازی گونه های مختلف استافیلیوکوک بود مورد بررسی قرار گرفتند. استافیلیوکوکوس اورئوس از گروه باکتری های کواگلوز مشتبه بعنوان فراوانترین گونه 63% و پس از آن گونه های مختلف استافیلیوکوک های کواگلوز منفی 37% بودند. کلیه سویه های کواگلوز مشتبه و منفی جدا شده در این تحقیق نسب به کلوگراسیلین 23% و 10% و انکومایسین 18% مقاومت کمی نشان دادند که این امر نشانه خوبی است بدین معنی که هنوز می توان از این آنتی بیوتیکها در درمان سویه های مقاوم به دارو های بتالاکتام مانند آموکسی سیلین استفاده نمود. در مطالعه AKO و همکاران،¹ الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک ها در بین گونه های مختلف استافیلیوکوک های کواگلوز منفی و مشتبه جدا شده از نوزادان و کودکان بستری در نیجریه بررسی شد و مشخص گردید که 68% از سویه های استافیلیوکوکوس اورئوس به آموکسی سیلین، 69% به کلوگراسیلین و 71% به تتراسایکلین مقاومت داشته اند.² در مطالعه حاضر مقاومت سویه ها استافیلیوکوکوس مورد بررسی نسبت به آموکسی سیلین 93% به کلوگراسیلین 23% و نسبت به تتراسایکلین 70% بوده است. مقاومت سویه های ایرانی نسبت به آموکسی سیلین بیشتر 93% به 68% از سویه های جدا شده در نیجریه بوده در حالیکه مقاومت سویه های ایرانی نسبت به کلوگراسیلین کمتر است. مقاومت سویه های هر دو مطالعه نسبت به تتراسایکلین مشابه می باشد. تفاوت های موجود علاوه بر تفاوت جغرافیائی ممکن است به تفاوت در الگوی درمانی بین دو کشور مرتبط باشد. همچنین در مطالعه فوق 54% سویه ها مولد بتالاکتاماز بوده در حالیکه در مطالعه حاضر 73% سویه ها مولد بتا لاکتاماز شناسائی شدند. این نتیجه با توجه به تفاوت موجود در مقاومت نسبت به آموکسی سیلین بین نتایج دو مطالعه نیز مطابقت دارد.

نیز، ۲۰۰ سویه استافیلوکوک کوگولاز منفی Narayani و همکاران این روش سریع نشاسته از نظر تولید بتالاکتامز بررسی کرده و مشخص نمودند که ۱۵۰ نمونه معادل 74% مولد بتالاکتامز بوده اند (۱۲). در مطالعه حاضر نیز 73% سویه ها مولد بتالاکتامز می باشند که این نظر نتایج دو مطالعه با هم منطقه میباشد.

در مطالعه Khadri و همکاران که در سال ۲۰۱۰ انجام شد، بیشترین نمونه مورد بررسی مربوط به نمونه های ادرار معادل $27/2\%$ پس از آن چرک $23/4\%$ و سواب زخم $22/6\%$ بوده است. همچنین بیشترین گونه

تولید آنزیم بتالاکتماز است، گرچه جهت تعیین نوع آنزیم به بررسی‌های مولکولی نیاز است.

تشکر و قدردانی
بدینوسیله از سرکار خانم خدیجه چکانیان مسئول بخش میکروبشناسی آزمایشگاه بیمارستان سینا که در جمع آوری نمونه‌ها نهایت همکاری را نمودند تشکر می‌نماییم.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق اولاً میزان حساسیت سوبه‌های استافیلوکوک اعم از کواگولار مثبت و منفی نسبت به ونکومایسین و کلوگراسیلین در مقایسه با نتایج سایر مطالعات پائین تر می‌باشد. ثانیاً از آنجایی که ۷۳٪ از سوبه‌های کواگولار مثبت و منفی مولد آنزیم بتالاکتماز با روش غربالگری سریع نشاسته شناسایی شدند، بیشترین مکانیسم مقاومت این سوبه‌ها با

REFERENCES

1. Asl-Soleimani H, Afhami SH, Hajabdolbaghi M. Prevention and control of Nosocomial Infections. 10th ed. Tehran: Teimourzadeh publishers; 2007.1-3.
2. Bennet JV, Brachman PS. Hospital infection. Boston. Little Brawn and Co; ۱۹۷۹. 151- 160.
3. Montazeri M, Farhoadi B, Razavi S, Farhani A, Ghafori A. 17th ed. Harrison's Principle of internal medicine translation, Teimorzadeh publisher, 2008.
4. Carmen A; Marcella MD; Jaime F; Kevin P. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage in Patients Admitted To Driscoll Children's Hospital. Pediatr Infect Dis J: 2006 May, 25(5): 459-461.
5. Nowroozi J. Nosocomial infections. 1th ed. Tehran: Esharat publishers; 1994. 120-130.
6. Puri J, Mishra B, Mal A, Murthy NS, Thakur A, Dogra V, Singh D. Catheter associated urinary tract infection in neurology and neurosurgical units .J infect 2002 Apr; 44(3): 171-5.
7. Resistant evaluation against methicillin and vancomycin among *S.aureus* strains isolated from nosocomial infections(Dissertation).Tehran: Islamic Azad university of Pharmaceutical sciences ,2007.(Full text in Persian)
8. AKO-Nai AK, Aeleyni FM, Abodern OA, Kassim OO . Antibiotic resistance profile of staphylococci from clinical sources recovered from infants. Afr J Biotech 2005 Aug, 4(8): 816-822.
9. Murray P R, Jourgenson JH, Yolken RH, Baron EJ, Pfaller MA. 8th ed. Manual of clinical microbiology, Mosby publication; 2002. 300-320.
10. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. NCCLS 2003, 23(1).
11. Montgomery KL, Raymundo JR, Drew WL. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta lactamase in clinically significant bacteria. J Clin Microbiol 1979 Feb, 9 (2): 205-207.
12. Narayani TV, Shanmugan JJ, Naseema KK, Bhattacharya RN, KG Shyamkrishnan. Correlation between beta-lactamase production and MIC values against penicillin with coagulase negative staphylococci. J Postgrad Med 1989, 35(3): 147-151.
13. Khadri H and Alzohairy M. Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant and coagulase-negative staphylococci in a tertiary care hospital in India. Int J Med Med Sci 2010 APr, 2(4): 116-120.
14. Gad, Gamal Fadl M.; El-Ghafar, Abd El-Ghafar F. Abd; El-Domany, Ramadan A. A.; Hashem, Zeinab Shawky. Epidemiology and antimicrobial resistance of Staphylococcus isolated from different infectious diseases . Braz J Microbiol 2010, 41(2): 333-344.