

فراوانی و مقاومت گونه های مختلف استافیلوکوک و شناسائی سویه های مولد بتالاکتاماز با روش کاغذی سریع نشاسته

مژده حاکمی والا^{۱*}، پرویز کواکب^۲، فاطمه باقری بجستانی^۳، گلناز فاضل نجف آبادی^۴

۱. میکروب شناس، استاد یار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

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

۳. مربی گروه میکروب شناسی واحد علوم داروئی آزاد اسلامی

۴. دکتری حرفه ای داروسازی

* نشانی برای مکاتبه: ولنجک، بلوار دانشجو، خ کودکیار، دانشکده پزشکی، ط هفتم گروه میکروب شناسی تلفن ۲۳۸۷۲۵۵۶.

mojdeh_hakemi@yahoo.com

پذیرش برای چاپ: آبان هشتاد و نه

دریافت مقاله: شهریور هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل اهمیت عفونت های بیمارستانی و نقش استافیلوکوکها در ایجاد این عفونت ها هر ساله مطالعاتی در زمینه عفونتهای بیمارستانی و تعیین علل مقاومت این باکتریها به انواع مختلف آنتی بیوتیکها ی رایج ، همچنین اثر آنتی بیوتیکهای جدیدتر و پاسخ دهی آنها به عفونت های بیمارستانی صورت می گیرد. این مطالعه برای ارزیابی فراوانی عفونت های بیمارستانی بعلت گونه های مختلف استافیلوکوکها و میزان مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج و تعیین سویه های مولد بتالاکتاماز در بیمارستان سینای تهران انجام گرفت.

روش کار: از تیرماه ۸۶ تا ابتدای فروردین ۸۷، بمدت ۹ ماه ۱۰۰ سویه استافیلوکوک از نمونه های مختلف کلینیکی جدا شد. مقاومت و یا حساسیت سویه های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین ، جنتامیسین ، سفالوتین ، ونکومایسین، کلوزاسیلین و سفازولین در سویه های کواگولاز منفی و مثبت با روش دیسک دیفیوژن و بر اساس متد Kirby_Bauer انجام شد. بعلاوه توانائی تولید آنزیم بتالاکتاماز بعنوان یکی از راههای مقاومت در برابر دارو های بتالاکتام در این تحقیق با استفاده از روش سریع نوار کاغذی نشاسته تعیین شد .

یافته ها: فراوانی گونه های مختلف استافیلوکوک به ترتیب شامل : استافیلوکوک اورئوس ۶۳٪، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ۱۹٪، استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۱۶٪ و سایر گونه های کواگولاز منفی ۲٪ بوده و بیشترین مقاومت سویه های کواگولاز مثبت و در سویه های کواگولاز منفی نسبت به آموکسی سیلین و به ترتیب معادل ۹۳٪ و ۶۲٪ بوده است . بعلاوه بطور کلی ۷۳٪ از سویه های کواگولاز مثبت و منفی مولد این آنزیم بوده اند.

نتیجه گیری: با توجه به میزان بالای تولید بتالاکتاماز در بین سویه های کواگولاز منفی و مثبت (۷۳٪) بررسی شده در این مطالعه، بیشترین مکانیسم مقاومت سویه های مورد بررسی در این تحقیق نسبت به دارو های بتالاکتام، بدلیل تولید بتالاکتاماز می باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس، اورئوس، کواگولاز منفی، عفونت های بیمارستانی ، مقاومت،

مقدمه

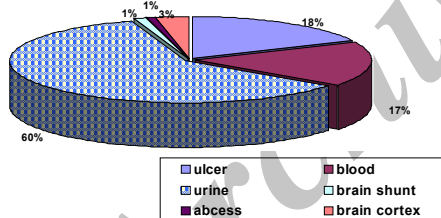
مدت بستری شدن بیماران در بیمارستان از ۱ تا ۳ روز افزایش یافته و این در حالی بوده که بیماران دیگری به دلیل نبودن تخت خالی جان سپردند. میزان ابتلا به این نوع عفونتها در بخش نورولوژی ۱٪ تا ۶۱/۵٪ در بخش سوختگی متغیر بوده است (۳ و ۲). Carmen و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ مطالعه ای انجام داده و مشخص کردند از بیماران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

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

ونکومایسین (۳۰ µg)، کلوزگراسیلین (۵ µg)، سفازولین (۳۰ µg) بر اساس پروتکل Kirby_Bauer انجام شد (۱۰). سویه های مقاوم به دارو های بتالاکتام و سفالوسپورین های ، سویه های کاندید بررسی از نظر تولید بتا لاکتاماز بودند . بدین منظور از روش سریع نواری نشاسته استفاده شد . در این تست در صورت تولید آنزیم بتالاکتاماز پنی سیلین شکسته و اسید پنی سیلونیکی ایجاد می گردد که در اینصورت به نشاسته متصل شده وبا ید واکنش رنگی ایجاد نمی کند. در صورتیکه باکتری مولد آنزیم نباشد نشاسته آزاد مانده و با ید واکنش رنگی ایجاد میکند (۱۱).

یافته ها

نمونه های 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 گونه های مختلف استافیلوکوک 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 تأییدی 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 استافیلوکوک تأیید شدند در ادامه با انجام تست کوآگولاز نمونه به دو دسته کوآگولاز مثبت و منفی تقسیم شدند. گونه های اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس با استفاده از دیسک نوویوسین 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 ۶۷٪ از نمونه ها از مردان و ۳۷٪ آنها از بانوان جدا شد. ۶۳٪ نمونه ها استافیلوکوکوس آرتوس، ۱۹٪ استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۱۶٪ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بودند. ۲٪ نمونه ها به گونه های کوآگولاز منفی دیگر تعلق داشتند.



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

حساسیت و یا مقاومت سویه های مختلف استافیلوکوک مورد بررسی در این مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های مورد بررسی در دو گروه سویه های کوآگولاز مثبت و منفی در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آموکسی سیلین ۹۳٪ و پس از آن نسبت به اریترومایسین ۸۰٪ در سویه های کوآگولاز مثبت وجود داشت در حالیکه میزان مقاومت سویه های کوآگولاز منفی نسبت به همین آنتی بیوتیکها کمتر و به ترتیب ۴۸٪ و ۳۸٪ بوده است. از بین باکتری های کوآگولاز مثبت ۶۳٪ و از بین سویه های کوآگولاز منفی ۲۷٪ با روش غربالگری سریع نواری نشاسته بعنوان مولد بتالاکتاماز شناسائی شدند. بدون در نظر گرفتن کوآگولاز ۷۳٪ سویه های استافیلوکوک جدا شده مولد بتالاکتاماز بودند.

از جمله مهمترین باکتری های مولد عفونتی های بیمارستانی می توان به اشریشیا کلی، کلبسیلا، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ، سودو موناس آنروژینوزا و انتروکوک ها اشاره نمود (۵). استافیلوکوکها ؛ کوکسی های گرم مثبتی بوده که معمولاً بصورت خوشه های انگوری بطور منظم کنار هم قرار می گیرند و در بسیاری از محیطها رشد می کنند. این باکتری ها نسبت به بسیاری از مواد ضد میکروبی سریعاً مقاوم شده و مشکلات درمانی عدیده ای را پدید آورده اند. استافیلوکوک های کوآگولاز منفی جزئی از فلور طبیعی انسان بوده ولی در افراد مسن، اطفال، بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و یا افرادی که دارای کاتتر یا پروتز مصنوعی هستند براضی بیماری ایجاد می کنند. حدود ۷۵٪ از عفونتهای ناشی از استافیلوکوک های کوآگولاز منفی به دلیل آلودگی با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس رخ میدهد . این باکتری ها از علل شایع عفونت های ادراری بانوان جوان می باشند. سویه های استافیلوکوکوس اورئوس علت تقریباً ۲۵٪ از عفونتهای بیمارستانی هم در بیماران جراحی شده و هم سایر بیماران می باشد (۶). این باکتری ها نیز مانند بسیاری از دیگر باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج مقاومت کسب نموده اند و خصوصاً سویه های مقاوم به متی سیلین به دلیل انتشار گسترده و نقش مهمشان در ایجاد عفونتهای بیمارستانی مورد توجه همگان میباشد (۷). AKO و همکاران در سال ۲۰۰۵، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیکها را در بین گونه های مختلف استافیلوکوک های کوآگولاز منفی و مثبت جدا شده از کودکان و نوزادان بستری در نیجریه تعیین کرده و مشخص نمودند ، ۶۸٪ از گونه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده به آموکسی سیلین، ۶۹٪ به کلوزگراسیلین و ۷۱٪ به تتراسیکلین مقاومت داشته اند و از این بین ۵۴٪ مولد بتا لاکتاماز بودند (۸).

از آنجائیکه هرگونه تصمیم گیری و تغییر در برنامه های کنترل عفونت نیازمند اطلاعات جامع و صحیح از وضعیت موجود در ایران می باشد ، بر آن شدیم تا در این تحقیق با تعیین فراوانی سویه های استافیلوکوک جدا شده از عفونتهای مختلف بیمارستانی و تعیین مقاومت آنها نسبت به داروهای رایج و در نهایت تعیین فراوانی سویه های مولد بتالاکتاماز در بین گونه های مختلف استافیلوکوک جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان سینای تهران به اطلاعات جدیدی دست یابیم که بتواند در برنامه ریزی بهداشتی کشوری موثر واقع 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 لاکتاماز انجام و نتایج حاصله ثبت گردید. نمونه برداری طی ۹ ماه از تیرماه ۱۳۸۶ لغایت فروردین ۱۳۸۷ از بیماران بستری در بیمارستان سینای تهران انجام شد. روی محیط خوندار کشت داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ 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 استافیلوکوک تأیید شدند. افتراق گونه های استافیلوکوکوس اورئوس ، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس با استفاده از تست کوآگولاز و تعیین حساسیت یا مقاومت نسبت به دیسک نوویوسین انجام شد (۹ و ۱۰). مقاومت یا حساسیت سویه های جدا شده نسبت به دیسکهای آنتی بیوتیک زیر شامل آموکسی سیلین (۲۵ µg) ، تتراسایکلین (۳۰ µg) ، اریترومایسین (۱۵ µg) ، کلرامفنیکل (۳۰ µg) ، کوتریموکسازول (۲۵ µg) ، جنتامیسین (۱۰ µg) ، سفالوتین (۳۰ µg) ،

نتیجه گیری

تولید آنزیم بتالاکتاماز است، گرچه جهت تعیین نوع آنزیم به بررسی های مولکولی نیاز است.

با توجه به نتایج این تحقیق اولاً میزان حساسیت سویه های استافیلوکوک اعم از کواگولاز مثبت و منفی نسبت به ونکومايسين و کلوزاسیلین در مقایسه با نتایج سایر مطالعات پائین تر می باشد. ثانیاً از آنجائی که ۷۳٪ از سویه های کواگولاز مثبت و منفی مولد آنزیم بتالاکتاماز با روش غربالگری سریع نشاسته شناسائی شدند، بیشترین مکانیسم مقاومت این سویه ها با

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از سرکار خانم خدیجه چکانیان مسئول بخش میکروبیشناسی آزمایشگاه بیمارستان سینا که در جمع آوری نمونه ها نهایت همکاری را نمودند تشکر می نمائیم.

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, Ghafari 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 methicilin 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, Aeleyi 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.