بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی

علی گودرزی[۱]، محمدرضا ذوالفقاری[۲]، محسن رضازاده[۳]، علیرضا آموزنده نوباوه[۴]، محمد ارجمندزادگان[۵]، احسان‌اله غزنوی راد*[۶]

تاریخ دریافت 1392/07/07 تاریخ پذیرش 1392/09/12

چکیده

پیش زمینه و هدف: آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری کش قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌های استافیلو کوکی مصرف می‌شوند. هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ مقاومت آمینوگلیکوزیدی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی است.

مواد و روش‌ها:طی مدت هشت ماه از۹۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی، ۵۳ مورد به عنوان MRSAایزوله گردید.حساسیت این ایزوله‌ها نسبت به امینو گلیکوزیدها به روش دیسک دیفیوژن بررسی و MIC تعیین گردید. در نهایت ژن‌های (2′)aph/(6′)aac .aph(3′)-IIIa, ant(4′)-Ia با روش PCR ارزیابی شدند.

نتایج: ۷۷/۳و۲۶/۴ درصد ایزوله‌ها نسبت به جنتا میسین ونتیل میسین مقاوم بودند. بر طبق نتایج حاصل ۷۷/۳ درصد ایزوله‌ها دارای ژن (2′)aph/(6′)aac و ۱۶/۹ درصد ایزوله‌ها دارای ژن aph(3′)-IIIa و۱/۸ درصد ایزوله‌ها دارای ژن ant(4′)-Ia بودند. همچنین ۱۶/۹درصد ایزوله‌ها دارای هردو ژن(2′)aph/(6′)aac و aph(3′)-IIIa بودند و ۱/۸ درصد ایزوله‌ها دارای هر سه ژن بودند.

نتیجه گیری: شیوع بالای ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و همچنین میزان بالای حداقل غلظت بازدارندگی رشد در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در این بیمارستان نشان دهنده فشار انتخابی آنتی‌بیوتیکی ناشی از مصرف بالای آمینوگلیکوزیدها در این بیمارستان است و این نکته حائز اهمیت باید مورد توجه کمیته کنترل عفونت بیمارستان قرار گیرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، ژنوتیپ

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره یازدهم، ص ۸۹۳-۸۸۳، بهمن ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: اراک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک، تلفن: ۰۹۱۸۶۹۲۸۲۳۷

Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

Archive of SID

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی یک معضل جهانی هستند و عوامل متعددی در بروز این عفونت‌ها دخالت دارند. میکروارگانیسم‌های مختلفی عامل این عفونت‌ها هستند و از دهه ۸۰ میلادی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس‌ها به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی مطرح هستند. در سال۱۹۶۰ اولین

[۱] دانشگاه ازاد اسلامی،واحد قم،گروه میکروبیولوژی،قم،ایران

[۲] دانشگاه ازاد اسلامی،واحد قم،گروه میکروبیولوژی،قم،ایران

[۳] گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک، اراک، ایران

[۴] گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک، اراک، ایران

[۵] گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک، اراک، ایران

[۶] استادیار گروه باکتری شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک ایران (نویسنده مسئول)

www.SID.ir

بیمارستانی می‌باشد این ارگانیسم عامل بیماری‌های شدید و مرگ‌ومیر در سراسر جهان است و در حال حاضر برخوردار از مقاومت چند داروئی است که درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس را دچار مشکل نموده است(۱). به گونه‌ای که دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی CLSI مقاومت به متی‌سیلین را ۳۵/۹درصد در سال۱۹۹۲ و ۶۴/۴درصد در سال ۲۰۰۳ گزارش نموده است. این باکتری سبب ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله اندوکا ردیت، استئومیلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی،کورک یا دمل و غیره می‌شود. مقاومت به متی‌سیلین مستقل از تولید آنزیم بتا لاکتاماز می‌باشد و شیوع آن در کشورها و در زمان‌های مختلف متفاوت می‌باشد. علت بروز این مقاومت آنتی‌بیوتیکی کسب ژن کروموزومی (mecA) در این سویه‌ها است که سویه‌های MRSA را به وجود می‌آورد. همچنین امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جـــمله بتـالاکتـــام‌ها آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئیولون‌ها و ماکرولیدها کسب نموده‌اند (۲).

آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتـالاکتـــام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌هایی مانند اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود کاربرد دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصـــال به زیر واحد ریبوزومی 30s باعث تداخل در سنتز پروتئین‌های باکتری می‌شوند. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو،کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال سازی آنزیمی دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند. در این میان غیرفعال‌سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها[1] اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در گونه‌های استافیلوکوکی است.این آنزیم به سه رده مختلف بر اساس فعالیت تغییر دهندگی‌شان طبقه بندی می‌شوند که شامل آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها[2] آمینوگلیکوزیدفسفریل ترانسفرازها[3] و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانستفرازها[4] هستند(۳). در میان کوکسی‌های گرم مثبتی چون استافیلوکوک‌ها، انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها پنج نوع از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد که از این بین سه آنزیم ANT(4′)Ia,APH(3′)-IIIa، و(AAC(6′)/APH(2 که به ترتیب توسط ژن‌های aac(6′)/aph(2′), ant(4′)-Ia , aph(3′)-IIIa کد می‌شوند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا آن‌ها جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و همچنین سبب غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که از اهمیت بالینی و درمانی برخوردارند (۴).

لذا با توجه به حضور مداوم و گسترش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان مرکزی آموزشی اراک که در بررسی‌های اولیه نسبت به آمینوگلیکوزیدها هم از خود مقاومت نشان داده‌اند و با تاکید بر نقش آمینوگلیکوزیدها در درمان ترکیبی عفونت‌های استافیلوکوکی هدف این تحقیق بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها و تعیین فراوانی ژن‌های aph(3′)-IIIa،ant(4′)- Ia و aac(6′)/aph(2′) که از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و تشخیص باکتری‌ها:

در یک مطالعه مقطعی[5] ۹۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، از نمونه‌های بالینی نظیر زخم، ریه، خون، مایع مغزی نخاعی، ادرار و مایع مفصل از بیمارستان ولی عصر(عج) اراک طی مدت هشت ماه (مهر ۱۳۹۰ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۱) جمع‌آوری شد و سپس برای تعیین هویت ایزوله‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کواگولاز، ترمونوکلئاز مقاوم به حرارت و DNase استفاده شد و به این ترتیب ایزوله‌های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت و DNase مثبت به عنوان ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند(۵).

در نهایت از تمامی ایزوله‌ها در محیط LB Broth تهیه شده از شرکت (Germany, Merck) حاوی ۲۰درصد گلیسرول استوک (Glyserol stock) کشت ذخیره تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

[1] Aminoglycosid-modifying enzymes: AMEx
[2] Aminoglycosid -acetyltransferase: AACs
[3] Aminoglycosid- phosphotranferases: APHs
[4] Aminoglycosid- Nucleotidytransferases: ANTs

[5] cross sectional

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره (۱):تفکیک نمونه‌های MRSA بر اساس بخش بیمارستانی که نمونه از آن جدا شد

نمونه بخش	MRSA	خون	ریه	زخم	CSF	ادرار	مایع مفصل
ارتوپدی	۳(۵،۶%)	۰	۰	۱	۰	۰	۲
اتاق عمل	۳(۵،۶%)	۰	۱	۲	۰	۰	۰
عفونی	۱۹(۳۵،۸%)	۴	۶	۷	۰	۲	۰
جراحی	۱۵(۲۸،۳%)	۳	۴	۶	۰	۲	۰
ICU	۱۰(۱۸،۸%)	۲	۲	۳	۲	۱	۰
نورولوژی							
اورژانس	۳(۵،۶%)	۰	۰	۱	۰	۲	۰

تعیین استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA):

برای تعیین سویه‌های MRSA ابتدا از روش انتشار دیسک بر روی آگار استفاده شد. جهت تشخیص فنوتایپی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از دیسک ۳۰ میلی‌گرمی سفوکسیتین واگزاسیلین ۱ میلی‌گرمی (Mast,UK) طبق دستورالعمل CLSI استفاده گردید. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین بیشتر از ۲۱ میلی‌متر(< ۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین (< ۱۳) بیشتر از ۱۳ میلی‌متر بود نمونه را به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین(MSSA)، و در صورتی که قطر هاله نسبت به دیسک اگزاسیلین کمتر از ۲۱ میلی‌متر(< ۲۱) و نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۱۳ میلی‌متر (۱۳) >بود نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) در نظر گرفته شد (۶).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها:

برای تعیین مقاومت ایزوله‌ها نسبت به خانواده امینوگلیکوزیدی حساسیت آن‌ها نسبت به جنتا میسین ونتیل میسین از خانواده آمینوگلیکوزیدها مطابق روش انتشار از دیسک کربی – بائر[1] با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast UK) و با رعایت استانداردهای (Clinical and Laboratory Institute(۶)، بر روی ۵۳ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین صورت گرفت.

سپس قطر ناحیه مهار رشد باکتری اندازه‌گیری شد و پس از مقایسه با جدول استاندارد ایزوله‌ها به سه صورت مقاوم، نیمه حساس و حساس دسته بندی شدند.

تعیین MIC به روش میکرو دایلوشن براث برای جنتا میسین:

برای تعیین مقاومت ایزوله‌ها به جنتامیسین از روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده[2] استفاده شد. در این روش(رقیق‌سازی در آگار:Agar dilution method) رقت‌های متوالی از صفر تا بیش از ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مورد نظر که در این جا جنتامیسین می‌باشد(Germany, Merck) با غلظت ثابتی (Colony-forming unit/spot)$۱۰^{۴}$cfu/spot از سوسپانسیون باکتری که کدورت نهایی معادل ۰/۵مک فارلند را دارد در میکروپلیت مجاور می‌شود، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون کدورت یا OD (Optical Density)چاهک‌ها با دستگاه الایزاریدر (Statfax USA ,) بررسی و با OD قبل از انکوباسیون مقایسه می‌شود و پایین‌ترین غلظتی که مانع از رشد باکتری شده باشد به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود و طبق تعریف $MIC \geq 16\ \mu g/ml$ به عنوان سویه مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در نظر گرفته شد(۶).

استخراج ژنوم:

برای استخراج DNA از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کیت‌های استخراج (Bioflux)ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد.

تایید ژنتیکی ایزوله‌ها:

برای تایید از یک پرایمر Sa442 به عنوان مارکر ژنتیکی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید، سپس بررسی از نظر وجود ژن mecA به عنوان مارکر ژنتیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) بروی تمامی ایزوله به روش PCR صورت گرفت.برای اطمینان از درست بودن کار در آزمایش‌های PCR و الکتروفورز از نمونه استاندارد ATCC۲۵۹۲۳ به عنوان کنترل مثبت برای سویه استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین از

[1] Kirby-Bauer Disk Diffusion Method

[2] Minimum Inhibitory Concentration:MIC

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه استاندارد ATCC۷۰۰۶۹۸ به عنوان کنترل مثبت برای سویه‌های MRSA استفاده شد(۷).

واکنش PCR:

برای تکثیر ژن‌های aph(3′)-IIIa , ant(4′)-Ia و aac(6′)/aph(2′) که از شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و همچنین سبب غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که از اهمیت بالینی و درمانی برخوردار از سه جفت پرایمر اختصاصی (ژن فن‌آوران، ایران) که در سال ۲۰۰۶ توسط Nurittin و همکاران به کار برده شده استفاده گردید واکنش PCR برای ۵۳ ایزوله MRSA صورت گرفت. برای اطمینان از درست بودن کار در آزمایش‌های PCR و الکتروفورز از نمونه استاندارد ATCC۴۳۳۰۰ به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های مقاومت آمینوگلیکزیدی استفاده گردید(۸).

جدول شماره (۲): توالی آغازگرهای مورد استفاده به همراه اندازه محصولات قطعات PCR

ژن	توالی	سایز	منابع
Sa442	F: AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	۱۰۸	۷
	R: CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATAACAACA		
mecA	F: TCCAGATTACAACTTCACCAGG	۱۶۲	۸
	R: CCACTTCATATCTTGTAACG		
aac(6′)/aph(2′)	F: GAA GTA CGC AGA AGA GA	۴۹۲	۸
	R: ACA TGG CAA GCT CTA GGA		
aph(3′)-IIIa	F: AAA TAC CGC TGC GTA	۲۴۲	۸
	R: CAT ACT CTT CCG AGC AA		
ant(4′)-Ia	F: AAT CGG TAG AAG CCC AA	۱۳۵	۸
	R: GCA CCT GCC ATT GCT A		

مخلوط نهایی واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر: شامل ۰/۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰۰میکرومولار هر آغازگر، ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۲ میکرولیتر DNA الگو که با ۲۲/۸ میکرولیتر آب دیونیزه به ۵۰ میکرولیتر رسید. برنامه دستگاه ترموسایکلر در جدول شماره ۳ آمده است(۸،۷). محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱درصد از یکدیگر جدا شدند و سپس در زیر نور ماورا بنفش در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترنس ایلو میناتور مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی(سینا کلون، ایران) استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

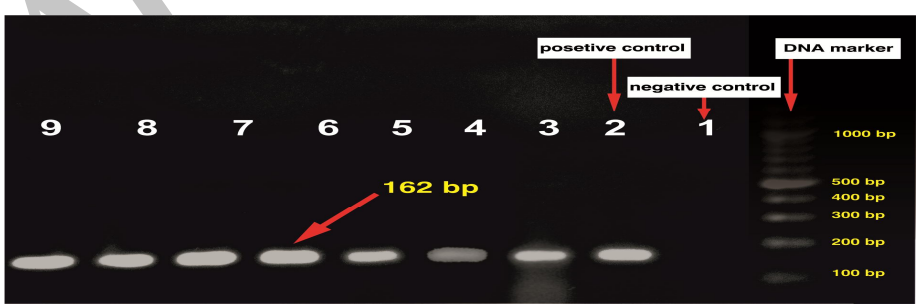
جدول شماره (۳): مراحل واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و Sa442 وmecA

پرایمر	واسرشتگی اولیه	واسرشتگی	اتصال	تکثیر	تکثیر نهایی
		Cycle			
Sa442	۹۶ °C - ۳min	۹۵ °C - ۳۰ s	۵۵ °C - ۳۰s	۷۲ °C - ۳۰s	۷۲ °C- ۵min
		۳۰cycle			
mecA	۹۵°C - ۴min	۹۴ °C - ۳۰s	۵۳ °C - ۳۰s	۷۲ °C - ۱min	۷۲ °C- ۴min
		۳۰Cycle			
aac(6′)/aph(2′)	۹۵°C - ۵min	۹۵ °C - ۲min	۵۴ °C - ۱min	۷۲ °C - ۱min	۷۲ °C- ۷min
		۳۰Cycle			
aph(3′)-IIIa	۹۵°C - ۵min	۹۵ °C - ۲min	۵۴ °C - ۱min	۷۲ °C - ۱min	۷۲ °C- ۷min
		۳۰Cycle			
ant(4′)-Ia	۹۵°C - ۵min	۹۵ °C - ۲min	۵۴ °C - ۱min	۷۲ °C - ۱min	۷۲ °C- ۷min
		۳۰Cycle			

نتایج

از ۹۸ایزوله بالینی مورد بررسی ۵۳ ایزوله به روش فنوتیپی به عنوان MRSAشناسایی شدند که تمامی این ۵۳ ایزوله از نظر وجود ژن mecA وsa44 مثبت شناسایی گردیدند.

شکل شماره (۱): الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن Sa442 (قطعه ۱۰۸ جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف ۱:کنترل مثبتATCC 25923 ردیف۲: کنترل مثبتATCC۷۰۰۶۹۸ ردیف۳:کنترل منفی ردیف ۴ تا۲۰سویه‌های بالینی



شکل شماره (۲): الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن mecA (قطعه ۱۶۲ جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف ۱: کنترل منفی ردیف۲: کنترل مثبت ATCC۷۰۰۶۹۸ ردیف۳تا۹:سویه‌های بالینی

حساسیت ایزوله‌های استافیلو کوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین و نتیل میسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی با استفاده از روش آنتی‌بیوگرام بررسی گردید که از ۵۳ ایزوله MRSA مورد مطالعه تعداد ۱۴ ایزوله

Archive of SID

www.SID.ir

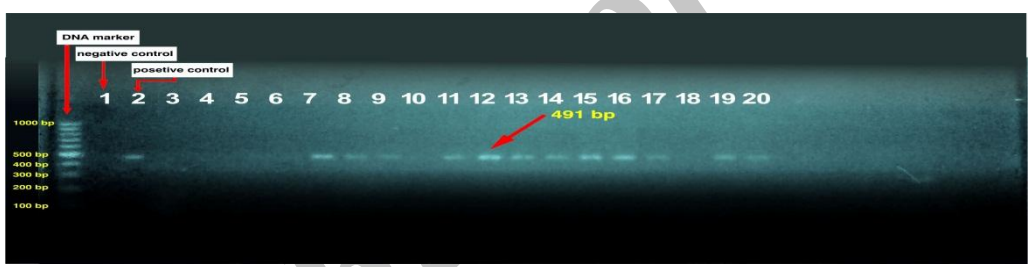
(۲۶/۴درصد) مقاوم به نتیل مایسین، ۴۱ ایزوله (۷۷/۳درصد) مقاوم به جنتا مایسین بودند و تعداد ۱۴ ایزوله (۲۶/۴درصد) مقاومت به هر دو آنتی‌بیوتیک را دارا بودند.

نتایج تعیین MIC که به روش میکرو دایلوشن براث با استفاده از پودر آنتی‌بیوتیکی جنتا مایسین برای ۴۱ ایزوله مقاوم به جنتا مایسین صورت گرفت نشان داد که ۷۵/۳درصد سویه‌ها نسبت به جنتا مایسین مقاومت نشان دادند، همچنین ۴۱/۳درصد ایزوله‌ها فنوتیپ مقاومت سطح بالا نسبت به جنتا مایسین (High-Level Gentamicin Resistance: HLGR) با MIC بیشتر یا مساوی ۱۲۸ میکرو گرم در میلی لیتر نشان دادند، که از این بین ۲۴/۳درصد ایزوله‌ها MIC برابر ۵۱۲ میکرو گرم در میلی لیتر، ۷/۳درصد ایزوله‌ها MICبرابر۲۵۶ میکرو گرم در میلی لیتر و۹/۷درصد ایزوله‌ها MIC برابر ۱۲۸ میکرو گرم در میلی لیتر داشتند.

جدول شماره (۴): نتایج تعیین MIC ایزوله‌ها نسبت به جنتا میسین

MIC	MIC ≥ 16 µg/ml	MIC ≥ 32µg/ml	MIC ≥ 64 µg/ml	MIC ≥ 128 µg/ml	MIC ≥ 256 µg/ml	MIC ≥ 512 µg/ml
۴۱ ایزوله مقاوم به جنتا میسین	%۱۴/۶ (۶ایزوله)	%۷/۳ (۳ایزوله)	%۱۲/۱ (۵ایزوله)	%۹/۷ (۴ایزوله)	%۷/۳ (۳ایزوله)	%۲۴/۳ (۱۰ایزوله)

فراوانی ژن‌های ant(4′)-Ia, aph(3′)-IIIa و aac(6′)/aph(2′) برای ۵۳ ایزوله MRSAبه روش PCR تعیین شد. بر طبق نتایج حاصل۴۱ایزوله (۷۷/۳ درصد) دارای ژن aac(6′)/aph(2′) و۱۹ایزوله (۱۶/۹ درصد)دارای ژنaph(3′)-IIIa و۱ایزوله (۱/۸ درصد) دارای ژن ant(4′)- Ia بودند. همچنین۱۹ایزوله (۱۶/۹درصد) دارای هردو ژنaac(6′)/aph(2′) وaph(3′)-IIIa بودند و۱ایزوله(۱/۸ درصد) دارای هر سه ژن بود.



شکل شماره (۳): الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن(aac(6′)/aph(2′ (قطعه۴۹۱جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف ۱: کنترل منفی ردیف۲: کنترل مثبتATCC۴۳۳۰۰ ردیف ۲ تا ۲۰:سویه‌های بالینی

شکل شماره (۴): الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن aph(3′)-IIIa′ (قطعه ۲۴۲ جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف ۱: کنترل منفی ردیف۲: کنترل مثبتATCC43300 ردیف ۲ تا۲۰:سویه‌های بالینی

Archive of SID

www.SID.ir

شکل شماره (۵): الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن ant(4′)-Ia (قطعه ۱۳۵ جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف۱-کنترل مثبت ATCC43300 ردیف۲-کنترل منفی ردیف۲ تا ۲۳ سویه‌های کلینیکی

بحث

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت در جامعه بوده و یکی از مشکلات اساسی سلامت جامعه در دنیا مقاومت دارویی است.بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های استافیلو کوکوس اورئوس مشکلات فراوانی در بیماری‌های ناشی از این ارگانیسم در نقاط مختلف جهان از جمله ایران ایجاد کرده است.جهت درمان مناسب و کنترل عفونت‌های بیمارستانی نیاز به دانستن الگوی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. به نظر می‌رسد همه گیرشناسی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در حال تغییر باشد، به طوری که مواردMRSA جدا شده، دیگر به بیماران بستری در بیمارستان‌ها یا افراد با عوامل خطر زمینه‌ای محدود نمی‌شود. با این حال هنوز مشخص نشده است که سویه‌های MRSA در جامعه، نوظهور هستند یا از عواقب تحصیل افقی ژن مقاومت به متی‌سیلین (موسوم به mecA) می‌باشند(۹).

عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاله مروری منتشر کردند که در آن شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) را در کلیه مقالات منتشر شده در ایران بررسی نمودند.بر طبق یافته‌های این تحقیق تاکنون ۲۶۹۰ مقاله و یا خلاصه مقاله در ارتباط با MRSA در ایران منتشر شده است که در این مقالات ۷۴۶۴ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی ژنتیکی (mecA) قرار گرفته است. بر طبق تحقیق صورت گرفته شیوع MRSA از ۹۰-۲۰ درصد متفاوت بوده است ولی میانگین شیوع آن در تهران ۵۲ درصد یافت گردید(۱۰). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در بیمارستان مرکزی آموزشی ولیعصر(عج) اراک به سطح ۵۴ درصد رسیده است. مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در جامعه و اختلافات سطح اجتماعی و اقتصادی مردم ساکن در این منطقه می‌تواند دلایل میزان شیوع بالای MRSA باشد. مقایسه شیوع MRSA در این مطالعه با کشورهای همسایه در خاور میانه(بجز عراق)نشان دهنده این است که میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در منطقه استان مرکزی بالاتر است(۱۱).ولی در مقایسه با گزارش‌های بین‌المللی شیوع MRSA در این مطالعه با میزان شیوع MRSA در کشورهای آرژانتین و مکزیک و آمریکای لاتین مساوی است.ولی از کشور استرالیا بالاتر می‌باشد،اما از میزان شیوع در ایالات متحده آمریکا کمتر است. عواملی که می‌تواند بر روی میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در کشورهای مختلف مؤثر باشد شامل سیاست‌های مختلف در اجرا برنامه کنترل عفونت،میزان و چگونگی تجویز آنتی‌بیوتیک، جمعیت، نوع یا تایپ سویه غالب و در نهایت به نوع متدولوژی آزمایشگاهی جهت تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بستگی دارد(۱۲).

آمینو گلیکوزیدها با وجود داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها وجود دارد هم چنان در درمان عفونت‌های جدی استافیلوکوکی با اهمیت می‌باشند و نقش مؤثری را درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌ها دارا هستند. مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی مانند بتـالاکتـــام‌ها، انتقال آمینوگلیکوزیدها را افزایش می‌دهند، بنابراین سبب افزایش اثرگذاری آمینوگلیکوزیدها می‌شوند. آمینوگلیکوزیدها ویژگی‌های متعددی دارند که می‌توان به فعالیت باکتری کشی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی‌بیوتیک[1] و آثار هم افزایی با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر بتالاکتام‌ها و گلیکو پپتیدها اشاره کرد. معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک‌ها تغییر و اصلاح آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است به صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر توانایی اتصال به ریبوزوم را ندارند. ژن‌های کد

[1] Post-antibiotic effect:PAE

Archive of SID

www.SID.ir

کننده این آنزیم‌ها یا روی پلاسمیدها یا روی کرموزوم قرار دارند (۱۳).

مقاومت به نئومایسین، توبرامایسبن، آمیکاسین جنتامایسن و کانامایسین در استافیلوکوک‌ها توسط آنزیم ANT(4)-I که به وسیله ژن ant(4′)-Ia کد می‌شود واسطه‌گری می‌شود،این ژن اغلب روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگاتیوی (Conjugative) مانند pSA41 و در نهایت درون منطقه mec از کرموزوم‌های استافیلوکوکوس اورئوس که احتمالاً نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه گری شده توسط IS2576(IS257-mediated recombination events) است الحاق می‌شوند. پلاسمید pUB110که ژن ant(4′)-Ia را حمل می‌کنند درون SSCmec الحاق شده است همچنین پلاسمید الحاقی حمل کننده ترانس پوزون Tn4001 که کد کننده ژن aac(6′)/aph(2′) هستند در SCCmec IVc گزارش شده‌اند (۱۴).

مطالعات متعددی ارتباط بین مقاومت به آمینو گلیکوزیدها و مقاومت به متی‌سیلین را نشان داده‌اند. نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داد که ژن aac(6′)/aph(2′) فراوان‌ترین ژن کد کننده آنزیم‌های AME در ایزوله‌های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است. همچنین طی مطالعه‌ای که توسط چوی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره جنوبی انجام شد نتایج مشابهی بدست آمد به این صورت که ژن aac(6′)/aph(2′) با فراوانی ۶۵ درصد شایع‌ترین ژن در میان ایزوله‌های مورد مطالعه بود و بعد از آن ژن‌های ant(4′)-Ia و aph(3′)-IIIa به ترتیب با فراوانی۴۱درصد و ۹ درصد شناسایی شدند (۱۵). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز حاکی از شیوع بالای ژن aac(6′)/aph(2′) نسبت به دو ژن ant(4′)-Ia aph(3′)-III می‌باشد.

همچنین طی مطالعه‌ای که توسط فتح‌اله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در ایران صورت گرفت با استفاده از روش PCR فراوانی ژن‌های AME تعیین و به این صورت گزارش شد که ژن aac(6′)/aph(2′) با فراوانی ۸۳ درصد دارای بیشترین شیوع پس از ان ژن‌های aph(3′)-IIIa و ant(4′)-Ia هر کدام به ترتیب با فراوانی ۷۱ و۲۶ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند(۱۶). نتایج تحقیق فتح‌اله‌زاده با مطالعه‌ای صورت گرفته طی این تحقیق مطابقت دارد، پس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این ژن هم اکنون ژن غالب کد مقاومت آمینوگلیکوزیدی با درجه بالا در بیمارستان‌های منطقه مرکزی ایران می‌باشد.

همچنین در سال ۲۰۰۱ ایدا (Ida) و همکاران طی تحقیقی که در ژاپن انجام دادند نتایج متفاوتی با آنچه که در کشورهای اروپایی به دست آمده بود گرفتند. در این بررسی که روی ۳۸۱ ایزوله بالینی صورت گرفت، ژن ant(4′)-Ia با فراوانی ۸۴/۵ درصد بیشترین شیوع را داشت وژن‌های aac(6′)/aph(2′) و aph(3′)-IIIa هر کدام با فراوانی ۶۱/۷ درصد و۸/۹ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شد اما در این تحقیق نتایج متفاوتی با آنچه اشاره شد به دست آمد به طوری که ژن ant(4′)-Ia بیشترین فراوانی را داشته است پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژن‌های مختلف ایجاد کننده مقاومت امینوگلیکوزیدی می‌توانند در کلون‌های مختلف MRSA در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت باشند(۱۷).

آقای یادگار در سال ۸۷ شیوع ژن ant(4)-Ia را در میان ایزوله‌های بالینی استاف اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش PCR را انجام داده و مشخص نمود با این روش ۵۸درصد سویه‌ها از نظر ژن ant(4)Ia مثبت بوده‌اند(۱۸). در تحقیق فوق ژن ant(4)-Ia بیشترین فراوانی را داشت در حالی که در مطالعات ما ژن aac(6′)/aph(2′) بیشترین فراوانی را داشت، شاید بتوان نتیجه گرفت که ژن aac(6′)/aph(2) میزان مقاومت آمینوگلیکوزیدی بیشتری را کد می‌کند.همچنین در منطقه جغرافیایی مثل ایران در استان‌های مختلف،ژن‌های متفاوتی می‌توانند علت بروز مقاومت باشند که می‌تواند بیانگر این مسئله باشد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خانواده آمینوگلیکوزید و همچنین مدت زمان استفاده در بیماران مختلف،شاید به نوعی در بیان ژن‌های مقاومت تأثیر داشته باشد.یا باکتری اولیه که در آن منطقه وارد شده حاوی کدام دسته از ژن‌ها بوده که می‌توان از روش‌هایی چون PFGE جهت دستیابی به این تفاوت‌ها و شباهت‌ها استفاده نمود.

بنابراین با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها و افزایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری

شیوع واقعی MRSA وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی دارد بنابراین عاقلانه است که به دلیل تغییر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس، بررسی‌های دوره‌ای این تغییرات هر ۳ تا ۴ سال یک‌بار انجام گیرد که ما باور داریم که در حال حاضر یک فرصت مداخله مؤثر در محدود کردن شیوع سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در سطح مراکز بهداشتی وجود دارد اما به طور قطع این فرصت در آینده وجود نخواهد داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین با توجه به نقش مؤثر آمینوگلیکوزیدها به صورت ترکیبی با سفالوسپورین‌ها جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس این آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت بسزایی در بیمارستان برخوردار می‌باشند لذا بررسی مقاومت در آن‌ها می‌تواند راه مؤثری جهت انتخاب درمان مناسب در این گونه‌ها عفونت‌ها باشد.

همچنین کمیته کنترل عفونت بیمارستانی نیز باید اقدامات مداخله‌ای مناسبی را در جهت کنترل تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها اتخاذ نموده و علاوه بر این با بهبود فرایندهای بهداشتی از گسترش این سویه‌های مقاوم جلوگیری نماید.

References:

1. Askarian M, Zeinalzadeh A, Japoni A. Prevalence of nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its antibiotic susceptibility pattern in healthcare workers at Namazi Hospital, Shiraz, Iran. IJID 2009; 13: 241-7.
2. Novick PR, Schelievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect 2001; 3(7): 585-94.
3. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999 ; 43(4): 727-37.
4. Ida T, okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of amion-glycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3115-21.
5. MacFadin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Philadelphia: Lippincott. Willialms and Wilkins; 2000.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th in-formational supplement, CLSI document M100–S20. CLSI,Wayne, PA; 2010.
7. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1998;36(3):618–23.
8. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. Microbiol Res 2006;161(1):49–54.
9. Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Vuopio-Varkila J. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Finland. Emerging Infect Dis 2002;8(6):602–7.
10. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderinasab M. Epidemiology of mecA-Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. Iran J Basic Med Sci 2012;15(5):1010–9.
11. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet 2006;368(9538):874–85.
12. Simor AE, Loeb M. Epidemiology of healthcare-associated Staphylococcus aureus infections. In: Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG, editors. Staphylococci in Human Disease. 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. P. 290–309.
13. Chandrakanth PK, Raju S, Patil SA. Amino-glycoside- resistance mechanisms in multidrug – resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. Curr Microbiol 2008; 56(6): 558-62.
14. Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the mec region of the

Archive of SID

www.SID.ir

chromosome of Staphylococcus aureus. Plasmid 1994; 31(1): 12-20.

15. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, et al. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococus.
16. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2009;33(3):264–5.
17. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol 2001;39(9):3115–21.
18. Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2009;15(2):109–13.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM NOSOCOMIAL INFECTIONS

*Ali Guodarzi[1], Mohammad Reza Zolfaghari[2], Mohsen Rezazadeh[3], Alireza Amouzandeh-Nobaveh[4], Mohammad Arjmandzadegan[5], Ehsanollah Ghaznavi-Rad[6]**

Received: 30 Sep , 2013; Accepted: 3 Dec , 2013

Abstract

***Background & Aims*:** Aminoglycosides are powerful bactericidal agents used in combination with betalactams or gelicopeptitds, particularly in the treatment of staphylococcal infections. The main objective of this study was to investigate phenotypic and genotypic properties of aminoglycoside resistance in methicillin resistant S. aureus.

***Materials & Methods*:** During 8 months, out of 98 Staphylococcus isolates recovered from clinical samples, 53 cases were identified as MRSA. The sensitivity of these isolates to aminoglycosides investigated through disk diffusion method and MIC is determined. Presence of ant (4′)-Ia, aph(3′)-IIIa and aac(6′)/aph(2') genes were investigated through PCR method.

***Results*:** 77.3 and 26.4 percent of isolates were resistant to gentamicin and netilmicin, respectively. According to the PCR result, 77.3 percent of isolates have aac(6′)/aph(2′) genes,16.9 percent have aph(3′)-IIIa genes and 1.8 percent of them have ant(4′)-Ia genes. 16.9 percent of isolates have both aac(6′)/aph(2′ and aph(3′)-IIIa and 1.8 have all three kinds of genes.

***Conclusions*:** High MIC levels to aminoglycosides and high prevalence of aminoglycosides resistant genes were determined in s.aureus isolated from different wards indicates the aminoglycosides selection pressure resulted from high consumption of aminoglycosides in this hospital, which is an important point to be considered in the infection control policy.

***Keywords*:** MRSA, Aminoglycoside resistance, Genotype

Address: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran ***Tel***: 09186928237
Email: e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2014: 24(11): 893 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran*
[2] *Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran*
[3] *Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[4] *Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[5] *Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[6] *Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (Corresponding Author)*

www.SID.ir