Archive of SID

مقاله پژوهشی

ردیابی مولکولی ژن‌های *qacA/B* و *smr* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴

حامد طهماسبی[1]*، محمد بکائیان[2]

۱. دانشجوی کارشناس‌ارشد باکتری‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران
۲. دانشیار، متخصص باکتری‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، عضو مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۳۱ فروردین ۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۹ تیر ۱۳۹۵

چکیده

اهداف مواد ضدعفونی‌کننده و آنتی‌سپتیک‌ها از گذشته برای ضدعفونی‌کردن وسایل و سطوح استفاده می‌شده است. در برخی موارد این مواد به‌واسطهٔ یک سری پروتئین‌های خاصی بی‌اثر می‌شوند که در باکتری ها حضور دارند. از مهم‌ترین ژن‌های به‌وجودآورندهٔ این امر می‌توان به *qacA/B* و *smr* اشاره کرد که در برخی موارد در سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متیسیلین (MRSA) دیده می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی ژن‌های *qacA/B* و *smr* در سویه‌های MRSA است.

مواد و روش‌ها هشتادونه ایزوله از نمونه‌های بالینی مختلف (خون، ادرار، کاتاتر، زخم، ترشحات و سایر) به‌واسطهٔ تست بیوشیمیایی اولیه جداسازی شد. غربالگری اولیه برای مقاومت به متی‌سیلین به‌روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) انجام شد. بعد از آن با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ردیابی ژن‌های *16sRNA*، *smr* و *qacA/B* انجام‌گرفت. در نهایت، با استفاده از آزمون آماری کای دو نتایج به‌دست‌آمده بررسی شد.

یافته‌ها از مجموع ۸۹ ایزولهٔ جدا سازی شده، ۵۹ ایزوله با آزمون‌های اولیهٔ فنوتیپی مقاوم به متی سیلین شناخته شد. از این میان ۵۰ ایزوله (۸۴/۷۴ درصد) دارای ژن *mecA*، ۱۴ ایزوله (۲۳/۷۳ درصد) دارای ژن *smr* و ۲۹ ایزوله (۴۹/۱۵ در صد) دارای ژن *qacA/B* بود. با ا ستفاده از آزمون‌های آماری و با توجه به p value به‌د ست‌آمده، ارتباط معناداری بین ژن‌های *qacA/B* و *mecA* به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از شیوع ژن‌های مورد مطالعه در شهر زاهدان و بالابودن فراوانی سویه‌های MRSA، باید با دقت بیشتری به استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده پرداخت. به‌دلیل حضور نمونه‌های مقاوم به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی جداشده، باید از غلظت مؤثر برای ضدعفونی سطوح و وسایل پزشکی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها:
استافیلوکوک اورئوس، ژن mecA، ژن qacA/B، smr.

مقدمه

پمپ‌های ترشحی چند دارویی پروتئین‌هایی در سطح غشای باکتری‌ها و معمولاً دارای چند کانال انتقالی برای جابه‌جاکردن مواد سمی به خارج از سلول است [۱]. بسترهای آن ممکن است بر اساس کاتیون‌ها، ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیم (qac) و مشتقات فسفونیم شکل بگیرد [۲]. این افلاکس پمپ‌ها ویژگی‌ای محافظتی برای باکتری به‌وجود می‌آورد که سبب خروج مواد سمی راه‌یافته به باکتری‌ها مانند آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی و ضدعفونی‌کننده‌ها می شود [۳]. حضور مستمر در برابر مواد سمی ژن‌های کدکنندهٔ این کانال‌ها را فعال و در نهایت باکتری را در مقابل آن‌ها مقاوم می‌کند [۴]. تعدادی از این ژن‌های مولد افلاکس پمپ‌ها در استافیلوکوکوس‌ها از جمله *استافیلوکوک اورئوس* شناسایی شده است.

aqcها از جمله پروتئین‌های ترشحی *استافیلوکوک*

* نویسندهٔ مسئول: حامد طهماسبی
نشانی: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی
تلفن: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵
رایانه: h.tahmasebi87@yahoo.com

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۴، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۶، ص ۳۶۷-۳۷۴.
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

www.SID.ir

Archive of SID

اورئوس است که به دو خانوادهٔ پروتئینی Major Facilitator Superfamily (MFS) و Small Multidrug Resistance (SMR) تقسیم می‌شود [۵]. ژن‌های *qacA/B* و *smr* از جمله ژن‌هایی است که مقاومت به کلرهگزیدین و آنتیموآن‌های چند ظرفیتی را سبب می‌شود. ژن‌های دیگری از جمله *qac J* و *qac H* و *qac G* هم در گروه qac در *استافیلوکوک‌ها* مطالعه شده است که از نمونه‌های دامی و مواد غذایی- لبنی جداسازی شده است [۵]. کلرهگزیدین از جمله ضدعفونی‌کننده‌هایی است که از سال ۱۹۴۵ برای ضدعفونی کاتاترها و ضدعفونی سطوح استفاده می‌شود [۲].

در برخی مطالعات، ظهور ژن‌های عامل مقاومت *qac* همراه با ژن‌های کدکنندهٔ مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جنتامیسین، تری‌متوپریم، پنی‌سیلین،کانامایسین و توبرامایسین روی عناصر ژنتیکی متحرک یافت شده است [۶، ۷]. در امر ضدعفونی سطوح و وسایل پزشکی و جلوگیری از انتشار آلودگی‌های باکتریایی، از ضدعفونی‌های چهار ظرفیتی آمونیم (qacs) مانند ستیل پریدینیوم کلراید، بنزالکونیوم کلراید، ستریماید، پروسئین و دتیزور در بیمارستان‌ها استفاده می‌شود [۸]. بالابودن فراوانی باکتری *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSAs) در محیط‌های بیمارستانی و استفادهٔ گسترده از شوینده‌های مختلف در ضدعفونی سطوح و ابزارهای پزشکی، سبب پیداشدن سویه‌های جدیدی شد که حامل ژن‌های مقاومت به مواد ضدعفونی کننده است [۹]. سویه‌های MRSA را نخستین‌بار در سال ۱۹۵۰ در کشور آمریکا شناسایی و گزارش کردند. از سال ۱۹۸۰ در بیشتر بیمارستان‌های دنیا به‌صورت اندمیک درآمد [۱۰ و ۱۱].

سازوکار اصلی مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوک اورئوس* مربوط به تولید پروتئینی به نام PBP2 است که میل ترکیبی کمی با بتا لاکتام‌ها دارد و سبب مقاومت به بتا لاکتام‌ها می‌شود [۱۲]. PBP4 و PBP2A انواع دیگری از PBP است. به‌دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، به این پروتئین بیشتر پرداخته می‌شود. تولید این پروتئین با ژن‌های *mec* موجود روی کروموزوم باکتری مرتبط است [۱۳].

در ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* می‌توان برای تأیید مولکولی از ژن *16SrRNA* استفاده کرد. علاوه‌بر این، حضور ژن *mecA* به بروز *استافیلوکوک اورئوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین کمک می‌کند [۱۴]. تصور بر آن است که گسترش وسیع در مصرف QACs ممکن است موجب فشار انتخابی شود و در پیدایش میکروارگانیزم‌های مقاوم به این مواد در محیط‌های کلینیکی دخیل باشد [۱۵]. در برخی مطالعات، افزایش ایجاد مقاومت در سویه های MRSA به عوامل ضدعفونی‌کننده گزارش شده است و در سال ۱۹۹۰ اولین مورد از این سویه گزارش شد که مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌ها را پیدا کرده بود [۱۶-۱۸]. ژن‌های *smr*، *qac B* و *qac A* که غالباً روی پلاسمید حمل می‌شود، معمولاً به‌دلیل این ویژگی خود، قدرت انتقال بالایی پیدا کرده است. این مطالعه با هدف ردیابی ژن‌های *qacA*، *qacB* و *smr* و مشخص‌کردن شیوع باکتری‌های مقاوم به ضدعفونی‌کننده‌ها، در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس* جداشده از بیمارستان‌های آموزشی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و شناسایی ایزوله‌های باکتریایی

در این مطالعهٔ توصیفی- مقطعی، طی دوره‌ای شش ماهه، ۳۴۹ نمونهٔ باکتریایی از بیماران بستری در بخش‌های مختلف مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد، شامل نمونه‌های خون، ادرار، زخم، ترشحات، آبسه، سواپ و، کاتاتر و سایر. بعد از کشت اولیه، نمونه‌های جمع‌آوری شده داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی دردار و حاوی محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) با ۱۰ درصد گلیسرول تلقیح و برای انجام آزمایش‌های تکمیلی و تشخیصی دقیق‌تر به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شد. تا زمان انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه های به‌دست‌آمده روی محیط Blood Agar (Merck آلمان)پایه که به ۵ درصد خون تازهٔ گوسفندی غنی شده بود، به‌صورت خطی کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ انکوبه شد. پس از مشاهدهٔ کلنی ها، رنگ‌آمیزی گرم انجام و کوکسی‌های گرم مثبت جداسازی شد.

برای اینکه بتوان استافیلوکوک‌ها را از استرپتوکوک‌ها تفریق داد، از تست کاتالاز با استفاده از کیت ZB-CAT (ZellBio آلمان) استفاده شد. برای تشخیص استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها هم از آزمایش اکسیاش و احیا (OF) Oxidation and fermentation test استفاده شد. برای تفکیک استافیلوکوک‌های کوگولاز مثبت از استافیلوکوک‌های کوگولاز منفی از تست کوگولاز لوله‌ایی (با استفاده از کیت Tadbirkit ایران) استفاده شد. در نهایت، ۸۹ ایزوله استافیلوکوک اورئوس بعد از انجام آزمایش‌های افتراقی از مجموع ۳۴۹ نمونهٔ جمع‌آوری‌شده به‌دست آمد. برای تأیید ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس به‌دست‌آمده از ژن *16SrRNA* استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین فنوتیپی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد، به‌طوری که نخست محلول نیم مک‌فارلند از کلنی‌های تعیین هویت‌شده تهیه شد. بعد از کشت در محیط Mueller Hinton agar (Merck آلمان) با ضخامت۵ میلی‌متر، دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم و اوگزا سیلین ۱ میکروگرم (هر دو mast انگلستان) با پنس استریل روی محیط قرارگرفت و به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بر اساس جدیدترین معیار CLSI 2015، در صورتی که قطر هالهٔ ایجادشده نسبت به دیسک سفوکسیتین بیش از ۲۱ میلی‌متر باشد، استافیلوکوک اورئوس حساس به سفوکسیتین در نظر گرفته می‌شود. در صورتی که قطر هاله نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۲۱ میلی‌متر باشد، ایزولهٔ استافیلوکوک اورئوس مقاوم به سفوکسیتین و در صورتی که قطر هالهٔ ایجادشده نسبت به دیسک اوگزاسیلین بیش از ۲۱ میلی‌متر باشد، استافیلوکوک اورئوس حساس به اوگزاسیلین در نظر گرفته می‌شود [۲۷]. در این مطالعه از سویهٔ استافیلوکوک اورئوس ATCC33591 برای سویهٔ استاندارد کنترل مثبت و از سویهٔ استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده شد [۲۸]. این سویه‌های استاندارد از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران و ایزوله‌های استاندارد ذخیره‌شده در بانک باکتریایی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تهیه شد.

آزمایش‌های مولکولی در تعیین ژن‌های *qacA/B*،*smr* و *mecA* در ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس

الف) استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA ژنومی، مراحل اولیه به‌صورت زیر انجام شد. نخست، ایزوله‌های بالینی تأییدشده با آزمایش‌های بیوشیمیایی ذخیره شده در ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد روی محیط Blood agar (Merck آلمان) با ۵ در صد خون گو سفند، ساب کالچر داده شد و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس، یک کلنی از هر ایزولهٔ کشت‌داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Btoth (Merck آلمان) تلقیح شد که قبلاً درون لوله‌های دردار شیشه‌ایی به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماری‌گذاری شده بود و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ساعت انکوبه شد. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های دردار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج سینا ژن ایران (Cat. No.PR881614) بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA به‌دست‌آمده در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای انجام آزمون‌های مولکولی ذخیره شد.

ب) آماده‌سازی پرایمرها

پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت ماکروژن به سفارش شرکت پیشگام ایران، بعد اضافه‌کردن حجم مورد نظر آب مقطر به رقت اولیهٔ ۱۰۰ پیکومولار رسانده شد. از پرایمرهای forward و reverse رقت ۲۰ پیکومولار تهیه شد. بعد از قراردادن پرایمرها در دمای ۴+ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت، رقت‌های استوک برای انجام آزمایش‌های بعدی تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شد. در این روند، از پرایمرهای جدول ۱ برای تکثیر ژن‌های *qacA/B*، *mecA* و *smr* در نمونه‌های مورد نظر استفاده شد.

ج) واکنش PCR

برای انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس 2x (شرکت Ampliqon آلمان) شامل -Tris and 1.5 mM $MgCl_2$، Hcl pH 8.5، (NH_4) SO_4، 3 mM $Mgcl_2$، Tween 20 0.2%، MmdNTP 4/4، Ampliqon polymeras 0/2 unit، Insert red dye and stabilizer استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی آب مقطر دیونیزه به‌کار رفت. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو برای کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. آزمون PCR برای ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Corbett CGI-96 (ساخت کشور آمریکا) طبق الگوی جدول ۲ تنظیم شد [۱۴].

جدول ۱. فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده‌شده برای شناسایی تکثیر ژن‌های *qacA/B*، *mecA* و *smr*

ژن‌های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (bp)	منبع
qacA/B	qacA/B F qacA/B R	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	۱۵۷	راگی و همکاران [۱۹]
mecA	mecA-F mecA-R	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	۵۳۳	نهایی و همکاران [۲۰]
smr	smr F smr R	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	۱۹۵	نوقاچی و همکاران [۲۱]
16sRNA	Staph756F Staph750R	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCCTCCGGTTTGTCACC	۷۵۰	مک‌کلور و همکاران [۲۹]

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. تنظیمات ترموسایکلر در تکثیر ژن‌هـای *smr*، *qacA/B*، *mecA* و *16SrRNA* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*

ژن	مراحل	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
qacA/B	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
	جفت‌شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طویل‌شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
	طویل‌شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱
mecA	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۳۰	
	جفت‌شدن پرایمرها	۵۵	۳۰	۳۰
	طویل‌شدن پرایمرها	۷۲	۳۰	
	طویل‌شدن نهایی	۷۲	۱۸۰	۱
smr	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
	جفت‌شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طویل‌شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
	طویل‌شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱

الکتروفورز روی ژل اگارز ۱ درصد

پنج میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱ در صد در بافر ۰/۵X الکتروفورز و برای مشاهدۀ باندها استفاده شد. هنگام تهیۀ ژل به آن ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضـافه شـد. نتیجۀ نهایی با دسـتگاه Gel Documentation system CCD (Kiagen-biotech CCD-Tab1 ایران) بر سی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر bp ۱۰۰ فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. آزمون PCR به‌عنوان گلداستاندارد در مقایسه با سایر نتایج استفاده شد.

آنالیزهای آماری

در مطالعۀ حاضـر، با اسـتفاده از نرم‌افزار SPSS نسـخۀ ۱۹ داده‌های بەد ست‌آمده بر سی و تجزیه‌وتحلیل آماری شد. برای این منظور از روش‌های آماری توصـیفی (تعیین فراوانی، درصـد و میانگین) اسـتفاده شـد. همچنین، آزمون آماری K2 برای مقایسـۀ یافته‌های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسۀ یافته‌های کمّی اسـتفاده شـد. در این مطالعه مقادیر p value در ژن‌های مختلف به‌دست آمد (مقدار $p\leq$۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد).

یافته‌ها

در مطالعۀ حاضـر، بیشـترین سـویه‌های *اسـتافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین مربوط به نمونه‌های گرفته شده از بیماران بستری در بخش‌های اطفال و ICU جداسازی شد (شکل ۱). از ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* به‌دست‌آمده ۵۹ ایزوله به روش فنوتیپی دیسـک دیفیوژن سـفوکسـیتین (۳۰ میکروگرم) و اوگزاسـیلین (۱ میکروگرم) مقاوم به متی‌سـیلین و ۳۰ ایزولۀ حساس به متی‌سیلین شناخته شد (جدول ۳).

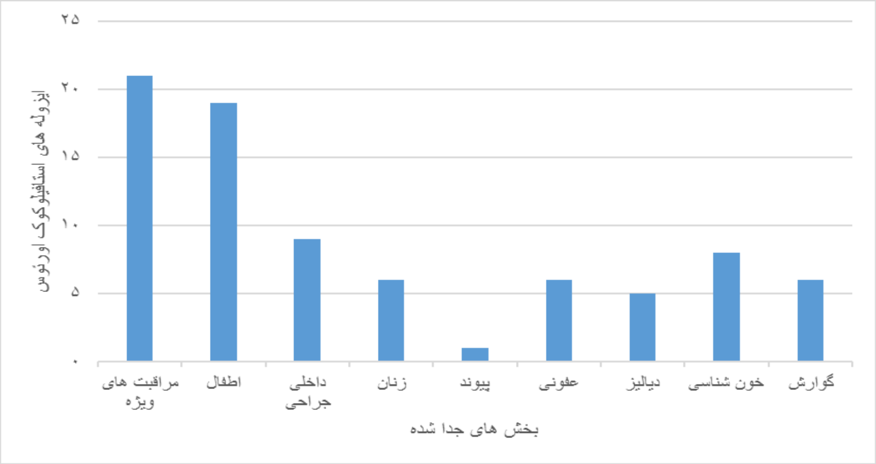
با بررسـی‌های مولکولی ایزوله‌های غربالگری‌شـده، ۵۰ ایزوله دارای ژن *mecA* بود (شکل ۲). ایزوله‌های جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های سـواپ بینی و ادرار بیشـترین فراوانی را از نظر حضـور ژن *mecA* داشـت. همچنین، نمونه‌های ادرار، خون و سـواپ بینی از نظر ژن‌های *qacA/B* و *smr* بیشـترین فراوانی را داشـت. کمترین فراوانی در بین نمونه‌های به‌دسـت‌آمده از نظر حضـور ژن‌های مورد مطالعه به نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی و خلط اختصاص داشت (جدول ۴).

برای بالابردن ضریب حساسیت در تشخیص ایزوله‌های بالینی / *استافیلوکوک اورئوس*، از ژن sRNA۱۶ ا ستفاده شد. از ۸۹ ایزولۀ تأییدشـده به روش‌های بیوشـیمیایی و با اسـتفاده از تسـت‌های بیوشـیمیایی، همۀ ایزوله‌ها این ژن را داشـتند. برای پی‌بردن به ارتباط یا عدم‌ارتباط حضـور ژن عامل مقاومت به متی سیلین و ژن‌های عامل مقاومت به بیو سایدها، بعد از تعیین هویت ایزوله‌های *اسـتافیلوکوک اورئوس*، حضـور ژن‌های *srm* و *qacA/B* بررسـی (شـکل ۲، ۳ و ۴) و با اسـتفاده از آنالیزهای آماری ارزیابی شد.

از میان ۳۰ سـویۀ حسـاس به متی‌سـیلین و فاقد ژن *mecA* که از نظر فنوتیپی هم منفی گزارش شـده بود، ۹ ایزوله ژن *qacA/B* دا شت و ۳ ایزوله هم حامل ژن *smr* بود (جدول ۳ و ۴). علاوه‌بر این، در ایزوله هایی دارای ژن *mecA* و مقاوم به متی سیلین، ۲۰ ایزوله ژن *qacA/B* و ۱۱ ایزوله ژن *smr* دا شت (جدول ۳ و ۴). با اسـتفاده از آنالیز آماری K2 مقادیر p value به‌دسـت‌آمده برای ژن های *mecA*، *qacA/B* و *smr* به‌ترتیب ۰/۰۰۳۳، ۰/۰۰۱۹ و ۰/۰۰۴۳ تعیین شد.

www.SID.ir

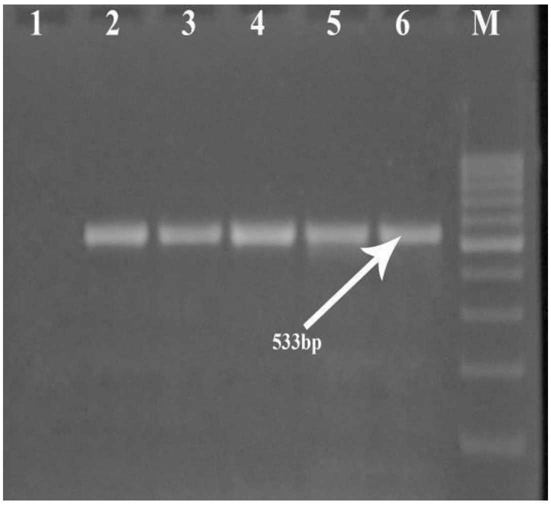
Archive of SID



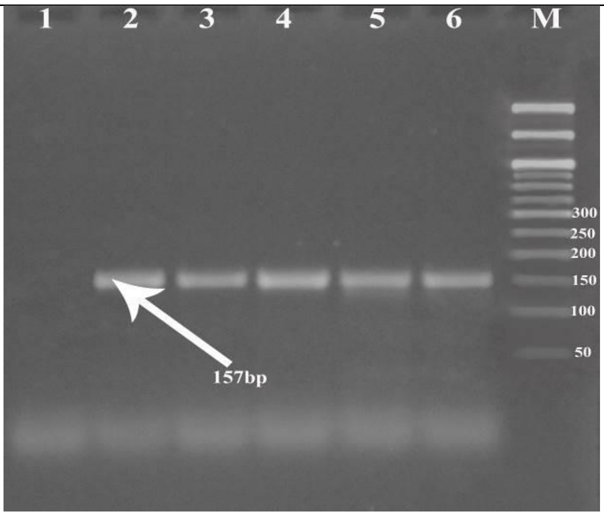
شکل ۱. فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* بر اساس بخش‌های جداشده از مراکز درمانی شهر زاهدان

جدول ۳. فراوانی ایزوله‌های ا ستافیلوکوک حـ ساس به متی سیلین حامل ژن‌های عامل مقاومت به آنتی سپتیک‌ها و ا ستافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها بر اساس نوع نمونهٔ بالینی

ژن مورد مطالعه	*استافیلوکوک اورئوس* (n=۸۹)		
	حساس به متی‌سیلین (n=۳۰)	مقاوم به متی‌سیلین (n=۵۹)	p value
mecA	۰	۵۰	۰/۰۰۳۳
qacA/B	۹	۲۰	۰/۰۰۱۹
smr	۳	۱۱	۰/۰۰۴۳



شـــکل ۲. نتیجهٔ تکثیر ژن های *mecA* مربوط به عامل مقاومت به متی سیلین. چاهک‌های ۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *mecA* و داری وزن مولکولی ۵۳۳ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰جفت بازی است.



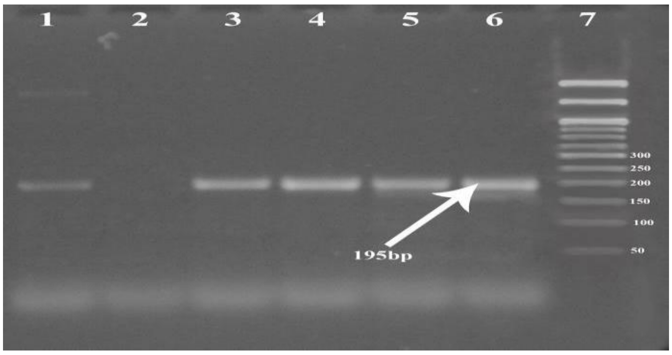
شـــکل ۳. نتیجهٔ تکثیر ژن های *qacA/B* مربوط به عامل مقاومت به دترجنت‌ها. چاهک‌های۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *qacA/B* و داری وزن مولکولی۱۵۷ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. فراوانی ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*

نمونه‌های بالینی	استافیلوکوک اورئوس (n=۸۹)					
	استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین (n=۳۰)			استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (n=۵۹)		
	mecA (n=۳۰)	*qacA/B* (n=۹)	*smr* (n=۳)	*mecA* (n=۵۰)	*qacA/B* (n=۲۰)	*smr* (n=۱۱)
کشت ادرار	۱۱	۴	۰	۱۹	۷	۲
کشت خون	۳	۰	۰	۶	۴	۰
سواپ بینی	۶	۲	۱	۱۱	۸	۶
زخم	۳	۱	۰	۴	۰	۱
کاتاتر	۱	۲	۲	۶	۱	۳
خلط	۵	۰	۰	۴	۰	۰
مایع مغزی- نخاعی	۱	۰	۰	۰	۰	۰



شـکل ۴. نتیجهٔ تکثیر ژن‌های *smr* مربوط به عامل مقاومت به دترجنت‌ها. چاهک‌های ۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *smr* و داری وزن مولکولی ۱۹۵ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

بحث

در این مطالعه، به بررسی ژن های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در سال ۱۳۹۴ در شهر زاهدان پرداختیم. شیوع سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* از سویی با فراوانی بالا مشاهده شد. حضور ژن های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک ها و آنتی‌موان‌های چهار ظرفیتی را نیز در طیف گسترده‌ایی از این سویه‌های مقاوم شاهد بودیم. از طرفی، با استفاده از آنالیزهای آماری مشخص شد که بین ژن عامل مقاومت به متی سیلین و ژن های *smr* و *qacA/B* ارتباط معناداری وجود دارد، به‌طوری که بیشترین میزان ایزوله های دارای ژن های مقاوم به آنتی‌سپتیک ها، از ایزوله های استافیلوکوک های مقاوم به متی‌سیلین جداشد و تعداد زیادی از ایزوله‌های مورد آزمایش هر سه ژن مورد مطالعه را دارا بود. این در حالی بود که در بین ایزوله‌هایی که از نظر ژنوتیپی حساس به متی سیلین و فاقد ژن *mecA* بودند، تعداد بسیار کمی از ایزوله‌ها ژن‌های *qacA/B* و *smr* داشتند و هیچ یک از این ایزوله‌ها هر سه ژن را با هم نداشتند.

بیشترین میزان سویه‌های MRSA و دارای ژن‌های *qacA/B* و *smr* نمونه های ادراری و سواپ بینی بود. این امر نشان‌دهندهٔ توزیع سویه‌های مقیم در بینی در بین سویه‌های مقاوم است. این نتایج با گزارش‌های نوروزی و همکاران [۱۵] در تهران همخوانی داشت. در هر دو مطالعه، شیوع بالای ایزوله‌های حامل این ژن‌ها مشاهده شد. این در حالی است که ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* به‌طور طبیعی در قسمت بینی افراد مقیم است و حضور ژن‌های عامل مقاومت در بین این ایزوله‌ها را باید امری جدی در نظر گرفت [۲۲].

گزارش نوگاچی و همکاران [۳] از جداسازی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و شوینده‌های آنتی‌موآن چهار ظرفیتی از نمونه‌های سواپ بینی با نتایج مطالعهٔ حاضر همخوانی داشت. همچنین، نمونه‌های ادرار بیماران شامل بیشترین ایزولهٔ دارای ژن‌های *mecA*، *qacA/B* و *smr* بود. این موضوع علاوه‌بر اینکه نشان‌دهندهٔ حضور *استافیلوکوک اورئوس* در بین باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری است،گسترش قابل‌توجه ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی جداشده از عفونت‌های ادراری را نشان می‌دهد. این نتایج با مشاهدات اُتر و

www.SID.ir

Archive of SID

همکــاران [۶] در انگلیس همخوانی دارد. همچنین، نتـایج به‌دســت‌آمده از میزان بالای آلودگی بیماران بخش مراقبت‌های ویژه در مطالعۀ حاضــر با بررســی‌های آن‌ها کاملاً همخوانی داشــت، به‌طوری که بیش از ۶۰ درصــد از نمونه‌های این بخش حاوی ژن *qacA/B* و بیش از ۳۰ درصـــد هم دارای ژن *smr* بودند.

حضور هم‌زمان ژن‌های *qacA/B* بیان‌کنندۀ ارتباط حضور این ژن‌ها با ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین (*mecA*) بود. هورنر و همکاران [۲۳] در مطالعه‌ای مروری وجود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های عامل مقاومت به برخی بیوسیدها را گزارش کردند.

در مطالعات لانگتین و همکاران [۱۶] در کانادا، مک‌گان و همکاران [۲۵] در آمریکا، و والی و همکاران [۱۸] و نوگاچی و همکـاران [۲۶] در ژاپن بین ژن‌هـای عـامـل مقـاومـت بـه آنتی‌بیوتیک متی‌سـیلین و ژن‌های عامل مقاومت به بیوسـایدها ارتباطی گزارش نشـــد که با نتایج این مطالعه ناهمخوانی دارد. همچنین، در مطـالعـات ذکرشـــده فراوانی ژن *smr* بیش از *qacA/B* گزارش شده ا ست که از این نظر هم با مطالعۀ حا ضر هیچ‌گونه همخوانی ندارد. این ناهمخوانی در نتایج را می‌توان به اختلاف مناطق جداســازی‌شــدۀ نمونه‌ها، شــرایط آب‌وهوایی و جغرافیایی متفاوت، تفاوت وجود جهش‌های باکتریایی در نواحی مختلف و انتقالات ژنتیکی متفاوت در بین باکتری‌ها نسـبت داد [۲۴-۲۶].

زمانتار و همکاران [۲۸]، لی‌لاپورن و همکاران [۲۷]، و ســیجو و همکاران [۲۹] در مطالعات جداگانه‌ای روی حضــور ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و بیوسایدها، فراوانی بالای ژن *qacA/B* را نســبت به ژن *smr* گزارش کردند. حضــور بالای این ژن‌ها در نمونه‌های بالینی، به‌خصــوص در نمونه‌های ســواپ بینی و ادرار و کشــت خون، بیان‌کنندۀ ظهور عفونت‌هایی اســت که بر پایۀ *اســتافیلوکوک‌های اورئوس* اســتوار شــده اســت که علاوه‌بر داشـــتن ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، دارای ژن‌های مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌ها نیز ا ست. گ ستردگی این ژن‌ها در دنیا و ایران با ســرعت بالایی در حال افزایش اســت [۲۱]. با توجه به اینکه این ژن‌ها توانایی گردش بین‌ســویه‌ای را نیز دارد، باید با اتخاذ تدابیری نخســت از گســترش ســویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری کرد، سپس سویه‌های مقاوم به آنتی‌سپتیک‌ها را با شناسایی ژنتیکی کنترل کرد.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضــر حـــــضــور ژن‌های *qacA/B* و *smr* را در اســتافیلوکوکوس‌های اورئوس مقاوم به متی‌ســیلین بررســی و ضرورت وجود توجه بی شتر و تحقیق گ سترده‌تر در زمینۀ نوع، همچنین میزان مادۀ بیوســـــایدی مصــرفی در محصــولات بیوس ـایدی م ـورد م ـصرف گسترده را بیان می‌کند. همچنین، در بررســی حاضــر ارتباط قابل‌توجهی بین مقاومت به QACs و مقاومت به متی سیلین به‌د ست آمد. در نتیجه، ح ضور هر کدام از این شاخص‌های مقاومت ممکن است به گزینش مشترک این دو به‌دن بال در مان آنتی‌بیوتیکی یا به‌دن بال مصــرف مواد ضدعفونی‌کنندۀ حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیم منجر شود. در نهایت، حضــور ژن‌های *qac* در میان جمعیت اســتافیلوکوک اورئوس به‌خصوص سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها و توانایی آن‌ها در گســترش مقاومت تشــان و احتمال بروز مقاومت متقاطع با برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، اهمیت سازوکارهای اتخاذ شده در کنترل عفونت مؤثر و ا ستفاده از مواد بیو سایدی در غلظت تو صیه شده را بیش از گذشته بیان می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویســندگان این مقاله لازم می‌دانند از کارشــناســان آزمایشگاه میکروب‌شــناســی دانشــکدۀ پزشــکی زاهدان و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی- گرمســیری تشــکر کنند که ما را در انجام این طرح یاری کردند. این مقاله بخشی از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیتۀ اخلاق به شمارۀ ۷۱۵۲ است.

[1] Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. Mikrobiyoloji Bulteni, 2007; 41(2): 309-27.
[2] Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, et al. Recently introduced qacA/B genes in Staphylococcus epidermidis do not increase chlorhexidine MIC/MBC. J Antimicrob Chemother, 2013; 68(10): 2226-33.
[3] Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Asia during 1998 and 1999. Journal of Medical Microbiology, 2005; 54(Pt 6): 557-65.
[4] Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Molle G, Holzel C. First detection of the antiseptic resistance gene qacA/B in Enterococcus faecalis. Microbial Drug Resistance, 2012; 18(1): 7-12.
[5] Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in Staphylococcus species. European Journal of Microbiology & Immunology, 2015; 5(1): 44-61.
[6] Otter JA, Patel A, Cliff PR, Halligan EP, Tosas O, Edgeworth JD. Selection for qacA carriage in CC22, but not CC30,

www.SID.ir

Archive of SID

methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infection isolates during a successful institutional infection control programme. J Antimicrob Chemother, 2013; 68(5): 992-9.

[7] Mc Gann P, Milillo M, Kwak YI, Quintero R, Waterman PE, Lesho E. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes qacA/B and mupA in clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013; 77(3): 270-2.

[8] Aykan SB, Caglar K, Engin ED, Sipahi AB, Sultan N, Yalinay Cirak M. Investigation of the presence of disinfectant resistance genes qacA/B in nosocomial methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates and evaluation of their in vitro disinfectant susceptibilities. Mikrobiyoloji Bulteni, 2013; 47(1): 1-10.

[9] Nakipoglu Y, Ignak S, Gurler N, Gurler B. The prevalence of antiseptic resistance genes (qacA/B and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains. Mikrobiyoloji Bulteni, 2012; 46(2): 180-9.

[10] Wang B, Jessamine P, Desjardins M, Toye B, Ramotar K. Direct mecA polymerase chain reaction testing of blood culture bottles growing Gram-positive cocci and the clinical potential in optimizing antibiotic therapy for staphylococcal bacteremia. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013; 75(1): 37-41.

[11] Wan MT, Chou CC. Spreading of beta-lactam resistance gene (mecA) and methicillin-resistant Staphylococcus aureus through municipal and swine slaughterhouse wastewaters. Water Research, 2014; 64: 288-95.

[12] Huijbers PM, van Hoek AH, Graat EA, Haenen AP, Florijn A, Hengeveld PD, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms. Veterinary Microbiology, 2015; 176(1-2): 120-5.

[13] Uzunovic S, Bedenic B, Budimir A, Ibrahimagic A, Kamberovic F, Fiolic Z, et al. Methicillin-resistant S. aureus (MRSA), extended-spectrum (ESBL)- and plasmid-mediated AmpC ss-lactamase -producing Gram-negative bacteria associated with skin and soft tissue infections in hospital and community settings. Medicinski glasnik. official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina, 2015; 12(2): 157-68.

[14] Chen FJ, Huang IW, Wang CH, Chen PC, Wang HY, Lai JF, et al. mecA-positive Staphylococcus aureus with low-level oxacillin MIC in Taiwan. J Clin Microbiol, 2012; 50(5): 1679-83.

[15] Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. Detection of biocide resistance genes, qacA/B and smr, among isolated Staphylococcus aureus from clinical and non-clinical sources. Pejouhandeh, 2011; 16(2): 83-91.

[16] Longtin J, Seah C, Siebert K, et al. Distribution of antiseptic resistance genes qacA, qacB, and smr in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. Antimicrob, Agents Chemother, 2011; 55: 2999-3001.

[17] Stickler DJ, Thomas B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. J. Clin. Pathol, 1980; 33: 288-296.

[18] Vali L, Davies SE, Lai LL, Dave J, Amyes SG. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. J. Antimicrob. Chemother., 2008; 61: 524-532.

[19] Raggi C, Filippini P, Monaco M, Pantosti A, Creti R, et al. Methicillin resistance, biofilm formation and resistance to Benzalkonium chloride in staphylococcus aureus clinical isolates. Clin Microbial, 2013; 2(10): 121.135.

[20] 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 Journal of Microbiology, 2015; 8(8): e19945.

[21] Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 2006; 44(6): 2119-25.

[22] Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. Detection of biocide resistance genes, qacA/B and smr, among isolated Staphylococcus aureus from clinical and non-clinical sources. Pejouhandeh, 2011; 16(2): 83-91.

[23] Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012; 67(11): 2547-59.

[24] Longtin J, Seah C, Siebert K, et al. Distribution of antiseptic resistance genes qacA, qacB, and smr in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. Antimicrob Agents Chemother, 2011; 55: 2999-3001.

[25] McGann P, Kwak YI, Summers A, et al. Detection of qacA/B in clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a regional healthcare network in the eastern United States. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011; 32: 1116-9.

[26] Noguchi N, Hase M, Kitta M, et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett, 1999; 172: 247-53.

[27] Leelaporn A, Paulsen IT, Tennent JM, et al. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J Med Microbiol, 1994; 40: 214-20.

[28] Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes, 2011; 4(1): 1-9. doi: 10.1186/1756-0500-4-453.

[29] Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with b-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother, 2002; 46: 2797-803.

www.SID.ir