مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هشتم ● شماره ۳ ● صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۹ ● پاییز ۱۳۸۹

ویژگی‌های مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران و پرسنل بیمارستانی ارتش: بررسی مقاومت به متی سیلین

*ناهید دارابی[۱]، هادی حبیب الهی[۲]، کارن شهابیان[۳]

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۲/۱۲ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۴/۲۸

چکیده

سابقه وهدف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل عفونت بیمارستانی می‌باشد. افزایش بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی تشخیص سریع را جهت کنترل عفونت مطرح می‌کند. با استفاده از تکنیک‌هایی چون PCR که در کنار دقت در افتراق وشناسایی سویه‌ها قابلیت تکرار پذیری واجرای سریع وکم هزینه را دارد، می‌توان تنوع مولکولی استافیلوکوک‌های مقاوم به درمان را تعیین کرد و از آن جهت شناسایی ناقلین وبرنامه ریزی درمانی جهت تعیین آنتی بیوتیک مؤثر استفاده کرد، تحقیقات نشان داده است که سوش‌های مقاوم ومختلف استافیلوکوک اورئوس در اثر موتاسیون‌های ژنومی ایجاد می‌شوند.در این تحقیق سعی شده که با انجام روش سریع ودقیق مولکولی سوش‌های مختلف این باکتری طبقه بندی گردد.

مواد وروش‌ها: در طی مدت شش ماه از نه بیمارستان مربوط به ارتش در تهران، از بینی بیماران و پرسنل ونیز زخم‌های چرکین بیماران ۶۳۲ نمونه جمع‌آوری شد که پس از انجام تست‌های افتراقی ۱۴۶ سویه از باکتری استافیلوکوک اورئوس جدا گردید. حسا سیت این سوش‌ها نسبت به شش آنتی بیوتیک مختلف مورد بررسی قرار گرفت وبراساس استانداردهای NCCLS سوش‌های مقاوم، حد واسط و حساس مشخص شد. نمونه‌ها مورد استخراج DNA قرار گرفتند وبرای ۸ ژن مورد نظر در شرایط بهینه PCR انجام شد.در مرحله آخر الگوهای هضم شده توسط آنزیم‌های اختصاصی هر لوکوس مورد مقایسه وبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۶۳۲ نمونه جمع‌آوری شده ۱۴۶ سویه استافیلوکوک اورئوس به دست آمد که ۴۸ سویه مشترک در ۱۹ کلاستر جداگانه شناسایی شد. که ۹۰٪ این سویه‌ها مقاوم به متی سیلین بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: با استفاده ازروش MLRFT با هزینه کم قدرت افتراق وتکرار پذیری بالا (در مقایسه با سایر روش‌ها) قادر به شناسایی سویه‌های مختلف باکتری می‌باشیم. ۶۳٪ کلاسترها (۲۴ سویه) در کلاسترها دوتایی قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده انتقال عفونت به صورت محدود می‌باشند.در بررسی مقاومت به متی سیلین در صد سویه‌های مقاوم ۹۰٪ با کل سویه‌های مقاوم جدا شده (۵۵٪) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سویه‌های مقاوم به متی سیلین با سهولت بیشری منتقل می‌شود.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، عفونت بیمارستانی، متی سیلین، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR, MLRFT

مقدمه

در دهه‌های اخیراستافیلوکوک اورئوس (طلایی) به عنوان مهمترین عامل عفونت بیمارستانی مطرح گردیده است.یکی از مشکلات مرتبط با آن مقاومت آنتی بیوتیکی موجود می‌باشد. به طوری که اکنون بیش از ۹۰٪ از بیماران مبتلا به عفونت‌های یلوکوکی به پنی سیلین ویا آمپی سیلین پاسخ نمی‌دهند (۱، ۲).پس از ظهور مقاومت

۱ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، کارمند علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی ۶۶۰ نزاجا، دانشجوی دکتری قارچ‌شناسی (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۰۹۱۲۵۳۳۹۲۲۰ آدرس الکترونیک: ndarabi118@hotmail.com
۲ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، کارشناسی ارشد ژنتیک
۳ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی

www.SID.ir

به پنی سیلین آنتی بیوتیک‌های مقاوم به بتا لاکتاماز، از جمله: متی سیلین واگزاسیلین ونفیسیلین برای درمان عفونت‌های یلوکوکی معرفی شدند که اولین سویه‌های مقاوم در سال ۱۹۶۰ شناسایی شد وتا سال ۱۹۸۰ به سرعت مقاومت در بین سویه‌های باکتری معرفی شدندواکنون در مراکز درمانی مختلف جهان سویه‌های مقاوم اندمیک وجود دارد، به طوری که تا ۷۰٪ از عفونت‌های بیمارستانی ناشی از یلوکوک مقاوم به متی سیلین گزارش شده‌اند (۳، ۴).تنوع موجود در گونه‌های استافیلوکوک می‌تواند پاسخ به درمان را تحت الشعاع قرار دهد یعنی شناسایی گونه‌ها می‌تواند در نحوه انتخاب آنتی بیوتیک مؤثر باشد، لذا تعیین نوع باکتری (typing) استافیلوکوک حائز اهمیت است (۵، ۶). از طرفی وضعیت بهداشتی بیمارستان سبب انتقال عفونت می‌شود ودر این میان سابقه بیماری زمینه‌ای در افراد واستفاده از آنتی بیوتیک‌ها نقش مهمی دارد (۴، ۵، ۷). بر اساس آمار موجود شایعترین عامل عفونت‌های بیمارستانی در سطح جهان استافیلوکوک اورئوس می‌باشد (۱). افزایش بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی تشخیص سریع را جهت کنترل عفونت مطرح می‌کند، در بیمارستان‌های ارتش آمار و ارقامی از این مشکل در دسترس نمی‌باشد. ولی در نقاط مختلف جهان در حدود ۷۰٪ استافیلوکوک – اورئوس جدا شده که به صورت‌های مختلف (پنومونی وعفونت زخم) باعث آلودگی بیماران شده است (۲، ۳). با استفاده از تکنیک‌هایی چون PCR که در کنار دقت در افتراق وشناسایی سویه‌ها، قابلیت تکرار پذیری واجرای سریع وکم هزینه رادارد، می‌توان تنوع مولکولی وانواع استافیلوکوک‌های مقاوم به درمان را تعیین کرد ودر جهت شناسایی ناقلین وبرنامه ریزی درمانی جهت تعیین آنتی بیوتیک‌های مؤثراستفاده کرد (۸).

مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع مشاهده‌ای توصیفی- مقطعی است که ازبیماران بستری دربخش‌های جراحی، بیماران بستری دربخش‌های جراحی، نوزادان، ICU و CCU وپرسنل مرتبط با این بخش‌ها، طی مدت شش ماه (مرداد لغایت دی ماه) از ۹ بیمارستان مربوط به ارتش (خانواده، ۵۰۱،۵۰۲،۵۰۳،۵۰۴،۵۰۵،۵۰۶، گلستان، بعثت) در سال ۱۳۸۴، از بینی بیماران و پرسنل و نیز از زخم‌های چرکین بیماران نمونه‌برداری و نمونه‌ها در محیط مانیتول سالت آگار به مرکز ۶۶۰ آزمایشگاهی نزاجا (محل انجام تحقیق) انتقال یافت. جمع کل این نمونه‌ها ۶۳۲ عدد بود معیارانتخاب در این نمونه برداری بستری بودن دراین بخش‌ها و پرسنل مرتبط با آنها بود وگزینش نمونه‌های مثبت بر اساس انجام تست‌های افتراقی بر روی محیط کشت‌های مختلف بود که ۱۴۶ عدد باکتری استافیلوکوک اورئوس جدا گردید. این جدایه‌ها بر روی محیط بلادآگار، کشت و پس از نام‌گذاری در یخچال ذخیره شدند.

محیط‌های کشت و شرکت سازنده‌ی آنها:

Blood Agar (MERCK) ,EMB (MERCK) و Mueller Hinton Agar) (MERCK، Manitol salt Agar (MERCK) و آنتی‌بیوگرام‌ها: تشخیصی وافتراقی (پادتن طب).

حساسیت سوش‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس نسبت به شش نوع آنتی‌بیوتیک با استفاده از دیسک‌های پنی‌سیلین، کلرامفنیکل، وانکومایسین، کلیندامایسین، اریترومایسین و متی‌سیلین بر روی محیط مولر هینتون آگار و بر اساس استانداردهای NCCLS بررسی گردید و سوش‌های مقاوم، حساس و حدواسط مشخص شد.

محلول‌ها

بافر استخراج DNA , بافر TBE, بافر DNA loading buffer

استخراج DNA ژنومی:

به منظور استخراج DNA، روش زیر مورد استفاده قرار گرفت:

۱ـ مقداری از کلونی‌های استافیلوکوک اورئوس را از سطح محیط کشت برداشته و درون تیوب ml ۱/۵قرار داده شد،

۲ـ ml ۱ بافر استخراج DNA به آن افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی تکان داده شد،

۳ـ µl ۸۰-۷۰ از SDS ۱۰٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه به آرامی تکان داده شد،

۴ـ تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم انکوبه گردید،

۵ـ محلول‌ها را به دو تیوب تقسیم کرده و روی هر کدام µl ۵۰۰ مخلوط کلروفرم/ فنل با نسبت ۱: ۱ اضافه شد،

۶ـ پس از دو دقیقه تکان دادن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و rpm ۱۴۰۰۰سانتریفوژ گردیدند،

Archive of SID
www.SID.ir

۷ـ فاز بالایی (Supernatant) نمونه‌ها را به تیوب‌های جدید منتقل کرده و ۵۰۰ µl ایزوپروپانل نیز به آن افزوده شد،

۸ـ نیم تا یک ساعت نمونه‌ها را در دمای یخچال (°۴C-۰) نگهداری کرده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ انجام گردید،

۹ـ فاز بالایی را دور ریخته و DNA رسوب یافته به دست آمد.

کنترل کیفیت DNA: مطالعهٔ کیفیت DNA از دو طریق میسراست، یکی بررسی باندهای DNA بر روی ژل‌های الکتروفورزی و دیگری بررسی نسبت جذب‌های OD۲۶۰/OD۲۸۰ به وسیله اسپکتروفتومتری می‌باشد. اگر این جذب بین ۲-۱/۸ باشد کیفیت آن مطلوب است.

الکتروفورز بر روی ژل آگارز

تکنیک الکتروفورز ژل‌آگارز براساس روش Meyer و همکاران در سال ۱۹۷۶ انجام گرفت. برای تهیه ژل آگارز، ۲/۵ گرم آگارزساخت شرکت Merck در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE حل گردیده و برای حل‌شدن کامل آن، محلول جوشانده شد. پس از کمی‌سرد شدن، به میزانی که دمای آن باعث سوزش دست نشود، محلول درون ظرف مخصوص ریخته‌شده و شانه در یک طـرف آن (در قسمت بالا) قرار گرفت. چند دقیقه پس از اینکه محلول سرد و ژل پلیمریزه شد شانه از ژل خارج گردیده و دو چسپ انتهای ظرف از آن جدا گردید تا هنگام الکتروفورز جریان برق از داخل ژل عبور کند. سپس ظرف حاوی ژل درون دستگاه الکتروفورز افقی قرار گرفته و مخزن‌های دستگاه الکتروفورز به آرامی با بافر TBE پرگردید, به‌گونه‌ای که روی ژل نیز به اندازه یک میلی‌متر به وسیله بافر پوشانده شد. مرحله بعدی وارد کردن نمونه‌های حاوی DNA به درون چاهک‌های ژل می‌باشد. بدین منظور، مقدار ۵µl از نمونه با حجم مساوی از محلول بـافر نمونه مخلوط شده و با استفاده از میکروپیپت داخل چاهک‌های ژل پرمی‌گردد. آن‌گاه دستگاه الکتروفورز به منبع تغذیه متصل شده وسیستم روی ولتاژ ثابت قرار گرفت. به ازاء هر سانتی متر طول ژل از ۵ تا ۱۰ ولت برق می‌توان استفاده نمود. پس از اینکه ماده رنگی به انتهای ژل رسید دستگاه خاموش شده، ژل به همراه ظرف آن از دستگاه خارج و برای رنگ‌آمیزی به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه درون محلول ۰/۵ نانوگرم بر میلی لیتر اتیدیم‌برماید قرار داده می‌شود (برای رنگ آمیزی می‌توان اتیدیم برماید را به ژل یا بافر الکتروفورز نیز اضافه کرد که از این روش به خاطر آلودگی وسایل و ابزار استفاده نشد). سپس ژل از محلول رنگ‌کننده خارج و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در مـحلول تازه MgSo۴ با غلظت ۱ mM قرار می‌گیرد تا رنگ‌های اضافی روی سطح ژل و زمینه آن برطرف شود.در صورت رنگ بری صحیح، باندهای محتوی کم‌تر از ۱۰ ng DNA قابل مشاهده هستند.برای مشاهده باندهای مربوط به DNA، از دستگاه UV Transilluminator استفاده گردید که با استفاده ازآن نواحی قرارگیری DNA به صورت باندهای نارنجی پررنگی مشاهده می‌شوند.

طراحی آغازگرها: در این تحقیق از هفت ژن استفاده شد که توالی DNA این ژن‌ها در بانک ژنی با سایت اینترنتی .www.ncbi.nlm.nih gov/blast/blast.cgi موجود است. به منظور تکثیر این هفت ژن، آغازگرهایی برای ابتدا و انتهای آن‌ها طراحی شده که حدود ۵۰۰ bp از ژن‌های مذکور را تکثیر می‌نمایند. نام ژن‌ها، جفت آغازگرهای مربوطه و توالی این آغازگرها در جدول ۱ آمده است.راه‌اندازی **واکنش‌گرهای PCR:** برای این منظور ابتدا غلظت واکنش‌گرهای PCR برای حجم ۱۵ µl تنظیم گردید. مقدار مواد از طریق بروشور آنزیم و همچنین آزمایش‌های متوالی به دست آمده است.

سپس برنامهٔ PCR به منظورتکثیر ژن‌های مورد نظر در جدایه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس با استفاده از دستگاه ترمو -سایکلر بهینه‌سازی شد.

تعیین طول باندهای حاصل از PCR: به منظور تخمین طول باندهای حاصل از الکتروفورز، از دو نوع Ladder با مشخصات زیر استفاده گردید:

۱ـ اندازه قطعات Ladder, Middle DNA: ۱۰۰-۴۰۰-۸۵۰-۲۰۰۰-۵۰۰۰ Range, Ready-to-use ۶x: ۰/۱ml

۲ـ اندازه قطعات -۷۰۰-۶۰۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰ ۸۰۰-۹۰۰-۱۰۳۱ gene Ruler ۵۰bp DNA Ladder۵۰µg

کاربرد آنزیم‌های برش‌دهنده: جهت به‌دست آوردن الگوی پلی‌مورفیسم هفت ژن مورد نظر در بین سوش‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس، از آنزیم‌های برشی استفاده شد. با توجه به تفاوت توالی این ژن‌ها در سوش‌های مختلف و متفاوت بودن جایگاه‌های برش آنزیم‌های برشی، قطعاتی از DNA با اندازه‌های غیرمشابه ایجاد می‌شود که ملاک طبقه‌بندی قرار گرفته است. نام

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در PCR

Gene	Primer	Sequence (۵′ - ۳′)
Carbamate kinase (arcC)	arcC-Up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	arcC-Dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrogenase (aroE)	aroE-Up	ATCGGAAATCCTATTTCACATTC
	aroE-Dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC
Glycerol kinase (glpF)	glpF-Up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	glpF-Dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (gmk)	gmk-Up	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	gmk-Dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (pta)	pta-Up	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	pta-Dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (tpi)	tpi-Up	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA
	tpi-Dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A -acetyltransferase (yqiL)	yqiL-Up	CAGCATACAGGACACCTATTGGC
	yqiL-Dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

جدول ۲- آنزیم‌های برشی مورد استفاده در ایجاد الگوی پلی‌مورفیسم

آنزیم برشی	اندازه محصول(bp)	لوکوس
Hinf I	۵۷۰	arcC
Alu I and Cfo I	۵۳۶	aroE
Tsp۵۰۹ I	۵۴۳	glpF
Cfo I	۴۸۸	gmk
Rsa I	۵۷۵	pta
Bbu I and Mbo I	۴۷۵	tpi
Vsp I and Dde I	۵۹۸	yqiL

آنزیم‌های برشی مورد استفاده در این تحقیق، لوکوس مورد اثر آن‌ها و اندازه قطعات حاصل از اثر این آنزیم‌ها در جدول ۲ آمده است.

یافته‌ها

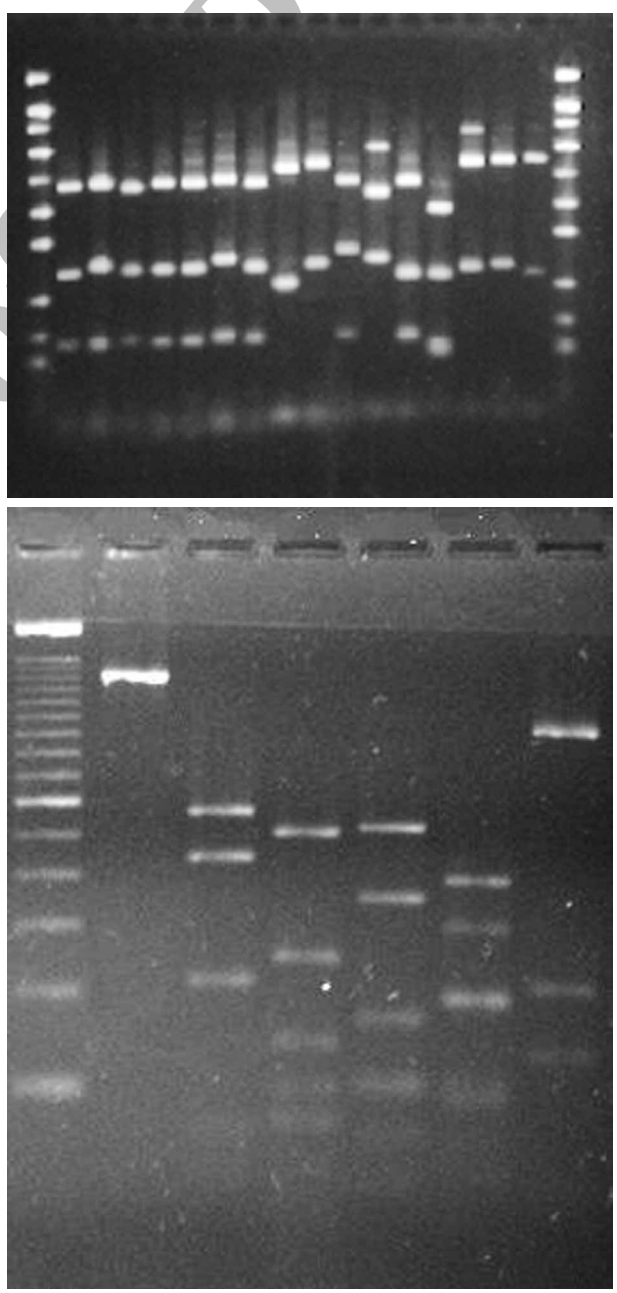
در این تکنیک DNA مربوط به ۱۴۶ سویه از استافیلوکوک‌های جمع‌آوری شده از سطح بیمارستان‌های ارتش، استخراج گردید. DNA استافیلوکوک اورئوس به صورت حلقوی است و طول آن ۲/۷۴۲۵۳ Mbp می‌باشد. میزان G+C این DNA، ۳۲/۸٪ است. این DNA دارای ۲۶۶۵ ژن است که ۲۵۱۵ پروتئین را به رمز درمی‌آورند (۱۱، ۱۴، ۱۵). از میان این ژن‌ها، هفت ژن مورد بررسی قرار گرفت بدین صورت که با استفاده از آغازگرهای از قبل آماده شده، (طبق جدول ۱) این ژن‌ها توسط PCR تکثیر داده شدند. با توجه به این که اختلاف سویه‌های مختلف باکتری‌های یک گونه، مربوط به متفاوت بودن جزئی توالی DNA آن‌ها می‌باشد، این اختلاف توالی معیاری برای طبقه‌بندی سویه‌های مختلف شده است (۱۵، ۱۶). در این تحقیق، اختلاف توالی DNA در هفت ژن ذکر شده در بالا مورد بررسی قرار گرفت. این ژن‌ها جزء ژن‌های housekeeping می‌باشند که وجود آن‌ها برای بقا باکتری‌ها ضروری است. به منظور پی بردن به اختلاف توالی این ژن‌ها، از آنزیم‌هایی با اثر محدود استفاده شد که لیست این آنزیم‌ها در جدول۲ وجود دارد. با توجه به اختصاصی بودن محل برش این آنزیم‌ها، تغییر حتی یک نوکلئوتید در DNA، برش آنزیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۷، ۱۸). بنابراین با متفاوت بودن محل‌های برش، الگوهای متفاوتی در مورد هر ژن در بین سویه‌های مختلف ایجاد می‌شود که از این الگوها به منظور دسته‌بندی و متمایز کردن سویه‌های استافیلوکوک اورئوس استفاده گردید (۱۵، ۱۹، ۲۰).

پس از به کارگیری آنزیم‌های گوناگون بر روی هر یک از هفت ژن

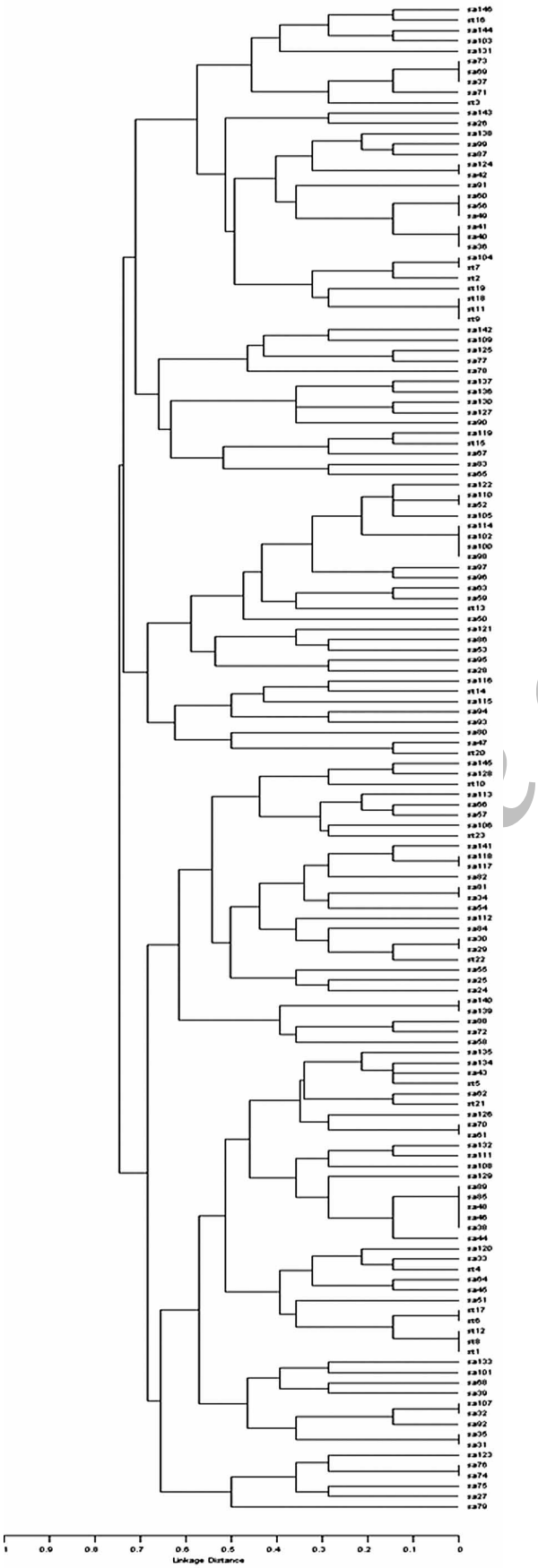
Archive of SID
www.SID.ir

تمامی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس و انجام الکتروفورز افقی، الگوی باندهای حاصله در بین تمام سویه‌ها مقایسه گردید. (شکل ۱) با ترسیم نمودار حاصل از این نتایج، نمودار شاخه‌ای زیر به دست آمد. (شکل ۲)

با بررسی این نمودار مشخص شد که از مجموع ۱۴۶ سویه مورد مطالعه، ۴۸ سویه مشترک در ۱۹ کلاستر جداگانه وجود دارد. این سویه‌های یکسان بیشتر مربوط به یک بیمارستان بوده‌اند اما موارد



شکل ۱ - نمونه‌هایی از الگوی باندی حاصل از برش یک آنزیم بر روی چند سویه مختلف (RFLP)

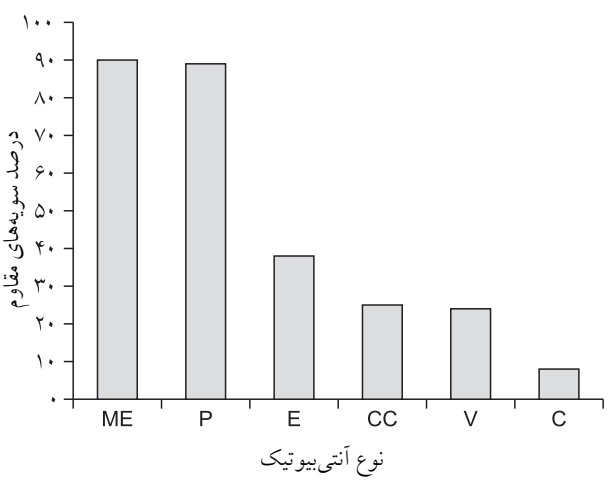


شکل ۲-

www.SID.ir

اندکی نیز وجود دارد که سویه‌های یکسان از دو بیمارستان بوده‌اند. ۶۳ درصد کلاسترها (که ۲۴ سویه را در بر دارند) در کلاسترهای دو تایی قرار گرفته‌اند که تفاوت بسیار اندک آن‌ها را نشان می‌دهد. در این نمودار، در هر کلاستر بزرگ، عمدتا سویه‌های به دست آمده از یک بیمارستان قرار گرفته‌اند. این موضوع نشان‌دهنده عدم انتقال گسترده باکتری و سطح قابل قبول بهداشتی در اکثر بیمارستان‌ها است. انتقال باکتری می‌تواند از طریق وسایل بیمارستانی، پرسنل بیمارستانی و اشخاص دیگری که با بیماران در تماس بوده‌اند، باشد و با قطعیت نمی‌توان گفت که دو بیمار با دو سویه مشترک از یکدیگر آلوده شده‌اند.

در این تحقیق، آزمایش‌های تعیین حساسیت سویه‌های کوآگولاز مثبت به روش انتشار دیسک در آگار بر اساس استانداردهای NCCLS نیز انجام گرفت. شش نوع آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، کلرامفنیکل، وانکومایسین، کلیندامایسین، اریترومایسین و متی‌سیلین به کار گرفته شد. بر طبق بررسی‌های صورت گرفته، حدود ۹۰ درصد از سویه‌های مختلف نسبت به متی‌سیلین مقاوم بودند. همچنین مقاومت این سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین حدود ۸۹ درصد، اریترومایسین حدود ۳۸ درصد، کلیندامایسین حدود ۲۵ درصدو وانکومایسین حدود ۲۴ درصد بود و سویه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس بیشترین حساسیت را نسبت به کلرامفنیکل نشان دادند، به طوری که فقط ۸ درصد از آن‌ها نسبت به کلرامفنیکل مقاوم بودند. (شکل ۳)



شکل ۳- مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها, P=Penicillin, C=Chloramphenicol, V=Vancomycin, CC=Clindamycin, E= Erytromycin, ME=Meticillin

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوک اورئوس در طی چند دهه گذشته مبدل به شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی شده است (۸، ۹). یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت می‌باشد. بدین صورت که با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید، سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته‌اند و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده‌اند. به عنوان مثال با ورود پنی‌سیلین به بازار و استفاده از این دارو در درمان بیماران بستری به سرعت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ظاهر گشتند (۹، ۱۰). امروزه در درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوک اورئوس از متی‌سیلین استفاده می‌شود که متاسفانه با ظهور سریع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، این نوع آنتی‌بیوتیک نیز کارایی خود را از دست داده است. بنابراین برای مقابله با سویه‌های این باکتری، مطالعات اپیدمیولوژیک و درک نحوه انتشار و گسترش این باکتری مهم به نظر می‌رسد (۴، ۱۰، ۱۱). قبل از ابداع روش‌های بیولوژی مولکولی، دانشمندان برای تحقیق در مورد گسترش بیماری، یافتن منابع عفونت و نیز نحوه انتشار عفونت، با مشکلات زیادی مواجه بودند. از اوایل دهه نود با ادغام روش‌های مولکولی و اپیدمیولوژی کلاسیک، مطالعات سودمندی صورت گرفت. امروزه روش‌های گوناگونی برای دسته‌بندی مولکولی سویه‌های مختلف استافیلوکوک اورئوس معرفی شده که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند که در میان آن‌ها تکنیک (MLRFT: Multi locus restriction fragments typing)، روشی به نسبت ارزان، ساده و دقیق می‌باشد (۱۲، ۱۳).

از مقایسه مقاومت‌های دارویی و بررسی نمودار حاصل از الگوی پلی‌مورفیسمی، می‌توان سهولت و سرعت انتقال سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین را نتیجه گرفت، زیرا در تمامی بیمارستان‌ها، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین وجود دارند.

به طور خلاصه، مزیت‌های روش MLRFT را می‌توان به صورت زیر بیان نمود:

۱ـ استفاده از قدرت تمایز بالای روش MLST (۱۰)،

۲ـ قابلیت مقایسه نتایج حاصله با نتایج به دست آمده در سایر آزمایشگاه‌ها.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه پرسنل بخش PCR آزمایشگاه مرکز تحقیقات ۶۶۰ و جناب آقای دکتر تاجیک تشکر می‌شود.

References

1- Stephan Harbarth; Carolina Fankhauser; Jacques Schrenzel; et al. Nosocomial Infection in Surgical Patients Staphylococcus aureus at Hospital Admission and Universal Screening for Methicillin-Resistant.JAMA. 2008, 299 (10): 1149-1157 (doi: 10.1001/jama.299.10.1149)

2- Otter JA, French GL. "Survival of nosocomial bacteria and spores on surfaces and inactivation by hydrogen peroxide vapor". J. Clin. Microbiol. 2009, 47 (1): 205–7.

3- BukharieH.A., AbdelhadiM.S., SaeeI.A., etal.Emergence ofMethicillin–resistant staphylococcus as a community pathogen. Diagn Microbiol.Infect Dis.2001, 40: 1-4

4- Freeman J, et al. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. http: //www.uptodate.com/home/index.html. Accessed March 16, 2010

5- DeplanoA., Vaneechoutte M., Verschraegen G.Typing of staphylococcus strains by PCRAnalysis of interIs256 spacer Length polymerase.J.clin.Microbiol 2003, 35: 2580-7

6- Ariza, J, .M.Pujol, Jacabo.Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant staphylococcus aureus with heterogeneous resistance to vancomycin.Lancet353: 1587-1588

7- Biebaum, g., K.fuchs, W.Lenz.1999.presence of staphylococcu aureus with rereduced susceptibility to vancomycin in germany.Eur.J.Microbiol.Infect.Dis.18: 691-696.

8- DosSantosSoares, M., J., M.C.dalsilvas-carvalho.2000. spread of methicillin- resistant s.aureus be longing to the brazilian epidemic clone in ageneral hospital and emergence of heterogeneous resistant to antibiotics among these isolates.J.Hosp.Infect.44: 301-308

9- Tenover, F.C., R.D.Arbiet, R.v.1996.Iterpreting chromosal DNA restriction patterns produced by pulced – field gel electrophoresis: J.clin.Microbiol.33: 2233-2239

10- Kikuchi, K.2002.Overview and strategy for methicillin resistant bacteria.Jpn.J.Med.Assoc.127: 347-353

11- Wallin TR, et al. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Emergency Medicine Clinics of North America. 2008;26: 431

12- Barbarini D., FumagalliP., Maronep., etal. Methicillin – resistant s.aureus in intensive care unit a one year survey. Infez Med 2001, .9: 237-45.

13- En right, M.c., N.p.Day, C.E.Davies, .S.J.Peacock.2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant of s.aureus.J.Clin.Microbiol. 38: 1008-1015.

14- Antibiotic resistance: Questions and answers. Centers for Disease Control and Prevention. http: //www.cdc.gov/getsmart/antibiotic-use/anitbiotic-resistance-faqs.html. Accessed March 16, 2010.

15- Archer GL. Staphylococcal infections. In: Goldman L, et al. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier; 2007. http: //www.mdconsult.com/das/book/body/189395219-4/968689922/1492/1112.html#4-u1.0-B978-1-4160-2805-5..50315-3--cesec33_13717. Accessed March 16, 2010.

16- Arvidson, S.o.1984.ExtracellularEnzyme of Staphylococcal infection Vol.2.london.Academic Press.pp 745-808.

17- Gmme, C.G, . Robert, C.E.1973 Toxin&Enzyme of coagulase negative staphylococci Isolated from Human Infection J.Hyg. epidemiol.Immuol.18: 261-266

18- Community-associated MRSA infection for the public. Centers for Disease Control and Prevention. http: //www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_public.html. Accessed March 16, 2010.

19- Sedar, h.s., Pfaller, M.A., Hollis, R.j.1999The use of molecular techniques in the epidemio-logyand control of infectins disease.Clin.Lab.Med.15, 407-431.

20- Lanotte, p.etal. 2004.Genetic feature of pseudomonas aeroginosa isolates from systic fibrosis patients compand those of isolates from other origions.J.Med. Microbiol.Jan 53 (pt1) 73: 81.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus Isolated from patients and personnel in Army hospital

*Darabi. N[1], Habibollahi. H[2], Shahbabian. K[2]

Received: 2 May 2010 Accepted: 19 Jul 2010

Abstract

Background: staphylococcus aureus has emerged over the past several decades as a leading cause of hospital- and community acquired infection. A significant component in the success has been its acquisition of antibiotic Resistant factors.We have developed a rapid and simplified approach for the strain characterization of staph.aureus on the basis of multilocussequence typing.

Method and material: MLRFT for s.aureus involes amplification of seven house keeping gene locus. the amplicons are then digested directly with one or two restriction Enzyme and the restriction fragments are resolved by agarose gel electrophoresis. These isolates had been additionally characterized for their susceptibilities to antibiotics.

Results: MLRFT resolved 146 isolates into 19 RFT that 48 isolates have the same molecular patterns. Their susceptibilities to antibiotics were showed 90% resistance to methicillin.

Conclusion: MLRFT provides convenient procedures for molecular epidemiology it requires minimal laboratory facilities and is relatively simple and inexpensive to perform.63% of cluster (24 isolates) take placed two fold cluster that 90% of them was resistant to methicillin, 55% belong to twofold cluster, there fore methicillin resistant isolates can transmit easily.

Keywords: staphylococcus aureus,Nosocomial infection, Restriction Enzyme, methicillin -resistance, MLRFT

Archive of SID

1- (*Corresponding Author) Researcher, Tarbiat Modarres University, Research Center of 660 Nezaja, Tehran, Iran
Tel: 09125339220 E-mail: ndarabi118@hotmail.com
2- Researcher, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

www.SID.ir