

بررسی فراوانی ژن های qacA/B و smr در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی مقاوم به متی سیلین

نویسندگان:

محمدبکائیان^{۱،۲}، جواد ادبی^۱، حامدطهماسبی^{*}

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- مرکز بیماری های عفونی گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

چکیده:

مقدمه: افزایش مصرف مواد ضد عفونی کننده باکتری کش منجر به پیدایش سویه های استافیلوکوکوس مقاوم به این مواد شده است. برخی از پژوهش ها همراهی ژن های عامل مقاومت به متی سیلین با این عوامل را تأیید کرده اند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن های مقاوم به مواد بیوسایدی همچون qac A/B و smr در استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی است.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نمونه های بالینی طی مدت نه ماه جمع آوری شد. بعد از آزمایش های بیوشیمیایی اولیه و تأیید جدایه ها از نظر جنس و گونه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن های qacA/B و smr با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز مورد بررسی قرار گرفتند. داده ها با استفاده از آزمون آماری کای مربع تحلیل شدند.

یافته ها: از ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۳۶ جدایه (۶۰٪) دارای ژن mecA بودند. از این تعداد، ۱۹ جدایه (۵۲/۷۷٪) دارای ژن qacA و ۲۱ جدایه (۵۸/۳۳٪) دارای ژن smr بودند. همچنین از ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپی درمیدیس، ۲۷ جدایه (۵۵/۱٪) دارای ژن mecA بودند که از این میان ۱۱ جدایه (۲۲/۴۴٪) دارای ژن qacA/B و ۸ جدایه (۱۶/۳۲٪) دارای ژن smr بودند.

نتیجه گیری: در نتایج به دست آمده از این پژوهش، حضور گسترده ژن های qac A/B و smr در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی مقاوم به متی سیلین مشاهده شد. با توجه به حضور کم ژن های smr و qacA/B در ایزوله های حساس به آنتی بیوتیک، بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی برای درمان عفونت های میکروبی، ضروری است.

واژگان کلیدی: مقاومت دارویی، استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین، qacA/B

Pars J Med Sci 2016;14 (3):9-18

مقدمه:

انسان زندگی می کند، در صورت فراهم شدن شرایط، شکل بیماری را به خود گرفته و سبب بروز عفونت می شوند [۳]. استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی مسئول بروز عفونت های گسترده ای در انسان و دام بوده و می توانند سبب انتشار عفونت های متعدد در بیمارستان و جامعه شوند [۴]. استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از مهم ترین استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی می باشند [۵]. این باکتری ها که سال ها به عنوان ساپروفیت محسوب می شدند، در دهه های اخیر به دلیل افزایش استفاده از وسایل پزشکی، مانند

کوکسی های گرم مثبت طیف بسیار گسترده ای از جنس و گونه های باکتریایی را در خود جای داده اند که هر کدام از این باکتری ها به نوبه خود سهم بالایی در ایجاد عفونت های اولیه و ثانویه دارند [۱]. استافیلوکوکوس های کوگولاز منفی از مهم ترین عوامل بیماری زای این گروه در ایجاد عفونت های ناشی از به کارگیری کاتترهای بیمارستانی هستند [۱]. این باکتری ها دارای ویژگی های چسبندگی خاصی هستند که این امر باعث تمایل ارگانسیم به اتصال و کلونیزه شدن در ابزارهای مصنوعی می شوند [۲]. این گروه که به صورت فلور نرمال روی پوست

* نویسنده مسئول، نشانی: زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه میکروبی شناسی

پست الکترونیک: h.tahmasebi87@yahoo.com

تلفن تماس: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵

پذیرش: ۹۵/۸/۱۸

اصلاح: ۹۵/۸/۷

دریافت: ۹۵/۴/۲۵

روش کار:

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۴۴۸ نمونه بالینی به مدت ۹ ماه در بازه زمانی بهمن‌ماه ۱۳۹۳ تا اواخر آذرماه ۱۳۹۴ از مراکز درمانی شهر زاهدان به شیوه آسان و در دسترس جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها شامل ادرار، خون، ترشحات زخم، خلط، لوله تراشه، لوله سینه و سر سوند بودند. معیار ورود به مطالعه، بیمارانی بودند که به مدت طولانی در بیمارستان بستری بوده و دچار عفونت‌های باکتریایی شده بودند. در آزمایشگاه ایزوله‌های استافیلوکوکوسوس با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد همچون کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول و dNase مشخص شدند. برای شناسایی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس علاوه بر استفاده از دیسک‌های نوویوسین و نالیدیسیک اسید (MAST، انگلستان)، از آزمون‌های PYR (Hardy Diagnostics، آمریکا) آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین و تولید اسید از قندهای مالتوز، تراهلوز، مانیتول و سوکروز و عدم تخمیر گلوکز در شرایط بی‌هوازی (با استفاده از انکوباتور CO₂ دار) برای جداسازی این دو گونه استفاده شد. در روش دیسک انتشاری ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و از این سوسپانسیون روی محیط Muller Hinton agar (Merck، آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک با یک پنس سترون روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. با استفاده از دیسک‌های نوویوسین، باسیتراسین و پلی میکسین B (همگی MAST، انگلستان) استافیلوکوکوس‌های اپیدرمیدیس از ساپروفیتیکوس شناسایی شد. برای جداسازی استافیلوکوکوس هومینیس از اپیدرمیدیس از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دیسفریوکسامین استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تمامی آزمون‌ها از سویه استافیلوکوکوسوس اورئوس ATCC 25923 به‌عنوان کنترل منفی و از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228، سویه استاندارد استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ATCC 15305 و سویه استاندارد استافیلوکوکوس هومینیس ATCC 27844 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جدایه‌های تأییدشده استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با استفاده از میکرو تیوب‌های حاوی Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Merck، آلمان) و ۱۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- ذخیره‌سازی شدند [۱۸-۱۳].

سوندها، کاترها و پروتزها به عوامل مهاجم و بیماری‌زا مبدل شده‌اند [۴]. این امر باعث شده است که این گروه از باکتری‌ها، به‌خصوص دو گونه نام‌برده، جزو باکتری‌هایی که باعث عفونت‌های بیمارستانی می‌شوند، طبقه‌بندی شوند [۵]. در بیشتر مواقع برای درمان عفونت‌های با منشأ استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی از داروهای گروه بتالاکتام استفاده می‌شود که سهم نسل‌های جدید سفالوسپورین‌ها در این زمینه بیشتر است [۶]. درمان عفونت‌های وابسته به این ارگانیزم با این گروه از داروها به دلیل افزایش سریع بروز مقاومت به آن‌ها با شکست مواجه شده است [۶]. حضور این باکتری‌های مقاوم در سطوح مختلف و استفاده از مواد بیوسایدی و ضدعفونی‌کننده، زمینه لازم برای ظهور سویه‌های مقاوم به مواد ضدعفونی‌کننده را در بین سویه‌های مقاوم افزایش می‌دهد [۳]. کلرهگزیدین و ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان از پرکاربردترین باکتری‌کش‌های بیمارستانی هستند که هم برای ضدعفونی کردن سطوح و هم در برخی موارد برای ضدعفونی وسایل مورد استفاده قرار می‌گیرند [۶]. حضور ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتام‌ها از جمله mecA می‌تواند زمینه لازم جهت پایداری باکتری در برابر درمان را ایجاد کند [۷]. این ژن در کنار ژن‌های عامل مقاومت به مواد ضدعفونی‌کننده می‌تواند باعث ظهور سویه‌های مقاومی شود که علاوه بر مقاومت ذاتی در برابر درمان، در برابر مواد بیوسایدی نیز از خود مقاومت نشان دهند [۷]. ژن‌های qacA/B و smr از جمله ژن‌هایی هستند که مقاومت به کلرهگزیدین و آنتیموان‌های چند ظرفیتی را سبب می‌شوند [۸]. در برخی مطالعات انجام‌شده، ظهور ژن‌های عامل مقاومت qac همراه با ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تری‌متوپریم، پنی‌سیلین، کانامایسین و توبرامایسین روی عناصر ژنتیکی متحرک یافت شده‌اند [۹، ۱۰]. گزارش افزایش جهش‌های ژنی در کنار عناصر متحرک وابسته به پلاسمید‌ها در بین باکتری‌های مقاومی که حامل ژن‌های mecA می‌باشند گزارش شده است [۱۱]. ژن‌های qac A، qac B، smr معمولاً روی پلاسمید حمل می‌شوند و به‌واسطه این ویژگی، قدرت انتقال بالایی پیدا کرده‌اند [۱۲]. ژن‌های دیگری از جمله qac J، qac H و qac G و هم در گروه qac در استافیلوکوکوس‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از نمونه‌های دامی و مواد غذایی - لبنی جداسازی شده‌اند [۱۳ و ۱۴]. با توجه به اهمیت مصرف مواد باکتری‌کش در بیمارستان‌ها برای ضدعفونی ابزار پزشکی و سطوح، ظهور باکتری‌هایی که به این مواد مقاوم هستند می‌تواند زمینه بروز عفونت‌های شدیدی را فراهم کند. از این رو هدف از انجام مطالعه حاضر، شناسایی ژن‌های qacA/B و smr در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین بود.

استخراج ژنومی

از میکروتیوب های حاوی Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Merck، آلمان) جدایه های بالینی نگهداری شده در -20°C درجه سانتی‌گراد روی Muller Hinton agar (Merck، آلمان) کشت داده شد و سپس چند پرگنه از هر جدایه کشت داده شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Loria Bertani Broth (merck آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه ای به تعداد جدایه ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند [۱۹]. بعد از ۲۰ ساعت، لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن انجام شد. در نهایت محصولات DNA به دست آمده بعد از سنجش کمی و کیفی توسط ژل آگارز ۱ درصد، برای انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر -20°C نگهداری شدند.

آماده‌سازی پرایمرها و آزمایش PCR

پرایمرهای مورد نظر بعد از اضافه کردن آب مقطر دیونیزه برای مدت ۴ ساعت در دمای $+4^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس رقت‌های ذخیره برای انجام آزمایش‌های بعدی تهیه و در دمای -20°C نگهداری شدند. در این فرایند از پرایمرهای زیر برای تکثیر ژن‌های qacA/B، smr و mecA در نمونه‌ها استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR برای هر ژن، ۲۵ میکرو لیتر از محلول نهایی شامل: ۱ میکرو لیتر از DNA الگو، ۱ میکرو لیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرو لیتر از مستر میکس 2x and 1.5 mM MgCl₂ (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل Tris-Hcl PH8.5, (NH₄) SO₄, 3mM Mgcl₂, unit Ampliqon 0/2, MmdNTP 4/4, 0.2% Tween20، polymeras، Insert red dye and stabilizer بود، برای تهیه میکس اولیه استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد [۱۴]. آزمون PCR برای ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، طبق الگوی تنظیم زیر انجام شد.

جدول ۱: فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای شناسایی ژن‌های qacA/B، smr و mecA جدایه های بالینی استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی

ژن‌های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (bp)	رفرنس
qacA/B	qacA/B F qacA/B R	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	۱۵۷	Raggi و همکاران [۲۰]
mecA	mecA-F mecA-R	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCGTCAGTACCGGATTGTC	۵۳۳	Nahaei و همکاران [۲۱]
smr	smr F smr R	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	۱۹۵	Noguchi و همکاران [۲۲]

جدول ۲: سیکل‌های حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ژن‌های qacA/B، smr و mecA در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی

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

یافته‌ها:

از تعداد ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جداسازی شده از نمونه‌های بالینی بخش‌های مختلف بیمارستانی، ۱۳ جدایه (۲۱/۶۶٪) از زخم، ۴ جدایه (۶/۶۶٪) از شالدون و کاتترها، ۴۰ جدایه (۶۶/۶۶٪) از ادرار و ۳ جدایه (۵٪) از خون، جداسازی شدند. بیشترین جدایه‌های به‌دست‌آمده مربوط به زنان بود (جدول ۳). در این بین ارتباط معناداری بین گونه‌های به‌دست‌آمده و جنسیت بیمارانی که نمونه‌های بالینی از آن‌ها گرفته شده بود، مشاهده نشد ($p > 0.05$). از ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌دست‌آمده ۵ جدایه (۱۰/۸۲٪) از زخم، ۱۵ جدایه (۳۰/۴۵٪) از شالدون و کاتترها، ۲۸ جدایه (۵۷/۱۵٪) از ادرار و ۱ جدایه (۲/۵٪) از خون بود (جدول ۴).

از مجموع این ۴۹ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۳۶ جدایه (۶۰٪) دارای ژن *mecA*، ۱۹ جدایه (۵۲/۷۷٪) دارای ژن *qacA/B* و ۲۱ جدایه (۵۸/۳۳٪) دارای ژن *smr* بودند. همچنین از ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۲۷ جدایه (۵۵/۱٪) دارای ژن *mecA*، ۱۱ جدایه (۲۲/۴۴٪) دارای ژن *qacA/B* و ۸ جدایه (۱۶/۳۲٪) دارای ژن *smr* بودند (نمودار ۱). بر اساس نتیجه آزمون آماری کای مربع مقادیر *P* value برای ژن‌های *mecA*، *qacA/B* و *smr* به ترتیب ۰/۰۱، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۵ به دست آمد که ارتباط معناداری بین حضور ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های عامل مقاومت به شوینده‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها مشاهده شد، بطوریکه بیشتر نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند، از نظر حضور ژن‌های *qacA/B* و *smr* نیز مثبت بودند. ارتباط معناداری بین نوع گونه‌های استافیلوکوکوس و نمونه‌های بالینی مشاهده نشد. در ضمن بعد از انجام مراحل ژل الکتروفورز محصولات به‌دست‌آمده از ژن‌های *mecA*، *qacA/B* و *smr* باندهای مورد نظر با وزن مولکولی به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ مشخص شدند (تصویر ۱ و ۲).

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

محصولات PCR ژن‌های *qacA/B*، *mecA* و *smr* هر کدام به ترتیب با طول ۱۵۷، ۵۳۳ و ۱۹۵ جفت باز توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند. برای این کار ۵ میکرو لیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز شد. برای رنگ دهی به ژل، به آن ۵ میکرو لیتر محلول Gel Red (Biotium، آمریکا) اضافه و خوب به هم زده شد. سپس ژل‌ها و باندهای آن‌ها در زیر نور ماورای بنفش در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس لومیناتور (UVT-20 SML، آمریکا) مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر مولکولی فرمنتاز (ThermoFisher، آمریکا) با توالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد [۱۷]. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک (کیاژن مدل CCD-Tab1، ایران) عکس‌برداری شد. در همه آزمایش‌های مولکولی از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 7644 برای حضور ژن *qacA/B* و سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 برای حضور ژن *mecA* استفاده شد [۱۰].

تجزیه و تحلیل داده‌ها

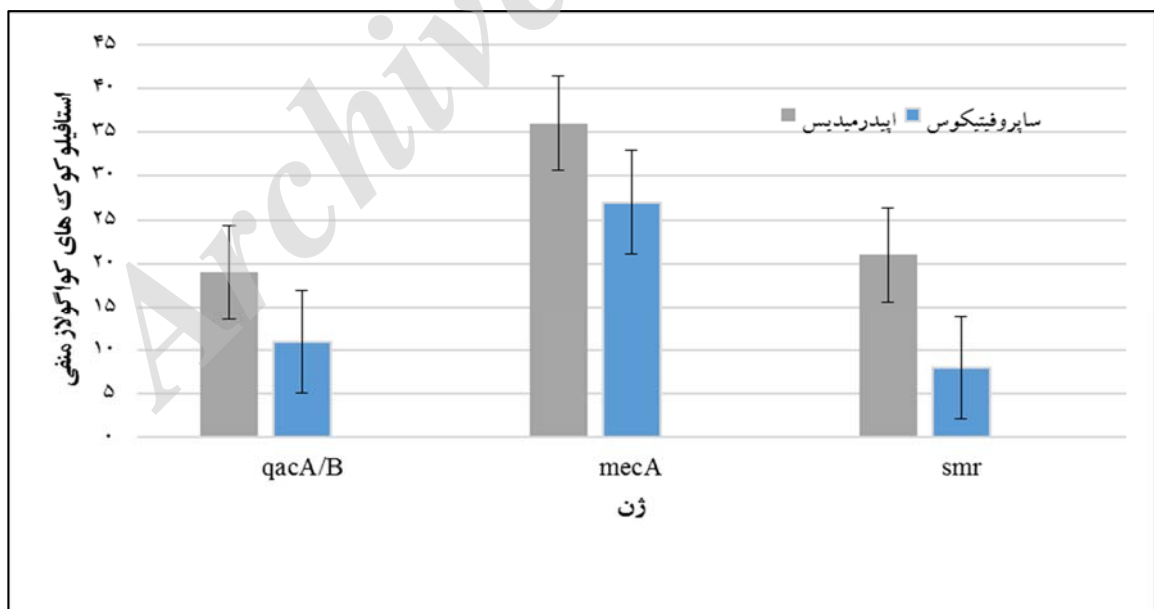
داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند. از روش‌های آماری توصیفی برای تعیین فراوانی، درصد و میانگین، از آزمون آماری کای مربع برای مقایسه یافته‌های کیفی و از آزمون تی مستقل برای مقایسه یافته‌های کمی استفاده شد. در این مطالعه مقدار $p \leq 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۳: فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس جنسیت بیمار *smr*، *qacA/B* و *mecA* در استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی

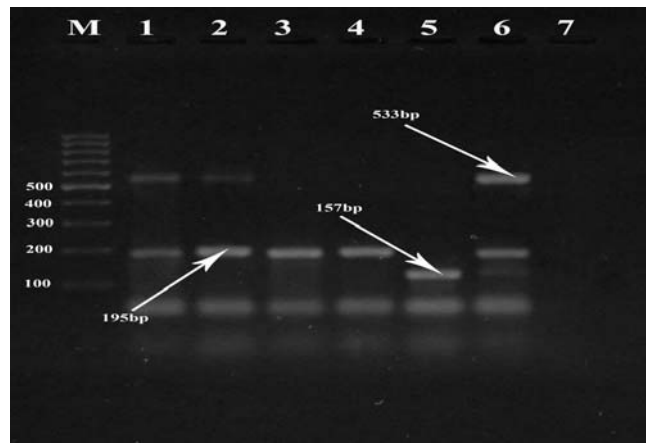
P value	استافیلوکوکوس کوگولاز منفی (n=۱۰۹)		جنسیت بیمار
	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (n=۶۰)	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (n=۴۹)	
	تعداد (%)	تعداد (%)	
۰/۶۹	۴۶ (۷۶/۶۶٪)	۳۹ (۷۹/۵۹٪)	زن
۰/۵۶	۹ (۲۳/۳۳٪)	۱۰ (۲۲/۶۵٪)	مرد

جدول ۴: فراوانی جدایه های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس نوع نمونه و بخش بیمارستانی جدا شده

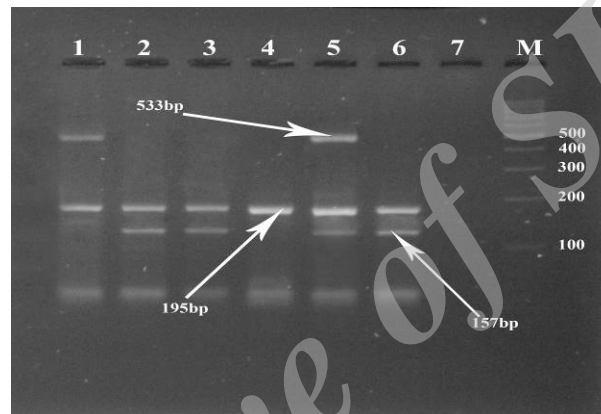
استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (n=109)							
بخش جدا شده	ادرار (%)		زخم (%)		خون (%)		شالدون - کاتتر (%)
	سپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سپروفیتیکوس
اطفال	۱ (۱۶)	۴ (۸۱٪)	۲ (۴٪)	۰	۰	۱ (۲٪)	۴ (۱۴٪)
ICU	۰	۰	۴ (۸٪)	۲ (۴٪)	۱	۰	۱ (۸٪)
داخلی-جراحی	۰	۰	۱ (۲٪)	۱	۱	۲ (۴٪)	۱ (۸٪)
P-ICU	۰	۰	۰	۰	۱ (۱٪)	۱ (۲٪)	۰
N-ICU	۰	۰	۱ (۲٪)	۰	۰	۰	۱
بیماران سرپایی	۱۹ (۳۱٫۶۶)	۲۳ (۴۶٫۹۳٪)	۵ (۱۰٪)	۰	۰	۰	۰
زنان	۸	۱۳ (۲۶٫۵۳٪)	۲ (۴٪)	۱ (۲٪)	۰	۰	۴
خون شناسی	۰	۰	۰	۰	۲	۰	۲



نمودار ۱: فراوانی ژن های qacA/B, smr و mecA در استافیلوکوک های کواگولاز منفی



شکل شماره ۱: نتیجه تکثیر ژن‌های *qacA/B* و *smr*، *mecA* مربوط به عامل مقاومت به متیسیلین و عامل مقاومت به بیوسایدها و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس. چاهک شماره‌های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه‌هایی که از نظر ژن‌های *qacA/B* و *smr*، *mecA* مثبت بودند. وزن مولکولی این قطعات به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ می‌باشد. M مارکر ۱۰۰ bp می‌باشد. چاهک ۶ کنترل مثبت، چاهک ۷ کنترل منفی.



شکل شماره ۲: نتیجه تکثیر ژن‌های *qacA/B* و *smr*، *mecA* مربوط به عامل مقاومت به متیسیلین و عامل مقاومت به بیوسایدها و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس. چاهک شماره‌های ۱ تا ۵ مربوط به نمونه‌هایی که از نظر ژن‌های *qacA/B* و *smr*، *mecA* مثبت بودند. وزن مولکولی این قطعات به ترتیب ۵۳۳، ۱۹۵ و ۱۵۷ می‌باشد. M مارکر ۱۰۰ bp می‌باشد. چاهک ۷ کنترل منفی، چاهک ۵ کنترل مثبت.

بحث:

عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان می‌باشد. همچنین بیشتر نمونه‌هایی که از آن‌ها باکتری‌های مذکور جداسازی شدند، نمونه‌های ادراری بود. این موضوع نشان‌دهنده نقش و حضور طیف وسیعی از اسافیلوکوک‌های کوگولاز منفی در بروز عفونت‌های ادراری، به‌خصوص در زنان است، به‌طوری‌که ۱۳ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۸ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از نمونه‌های ادراری از بخش زنان جداسازی شد. آنچه که باعث تفاوت مطالعه حاضر از سایر مطالعات داخلی شده است، بررسی حضور ژن‌های مقاومت و همینطور سنجش حساسیت سویه‌های مقام به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی متفاوت استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی نسبت به ماده بیوسایدی حاوی QACs است. نتایج این مطالعه نشان داد که از مجموع ۴۴۸ نمونه بالینی مورد بررسی، ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۴۹ نمونه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بودند.

استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده و بیوسایدها از سال ۱۹۴۰ اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند، به‌طوری‌که در بیشتر مواقع، در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها، اولین اقدام برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی و آشکار، استفاده از مواد بیوسایدی بوده و هست [۱۸]. امروزه مصرف بیش از اندازه مواد بیوسایدی ضد میکروبی منجر به ظهور سویه‌هایی با مقاومت ژنتیکی به این مواد شده است [۱۸]. استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی، می‌توانند از طریق آلوده کردن سطوح و ابزارآلات پزشکی نقش مهمی را در ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان ایفا کنند [۱۹]. در این مطالعه، بیشترین نمونه‌های بالینی به‌دست‌آمده از دو باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، از نمونه‌های بالینی مربوط به زنان بود. این امر توجیه‌کننده حضور برخی از گونه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس در ایجاد

استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، بیشترین جدایه‌های به دست آمده از نمونه‌های ادراری و کاتاترها بود. از نظر پراکندگی ژن‌ها، ۲۷ جدایه دارای ژن *mecA*، ۸ جدایه دارای ژن *smr* و ۱۱ جدایه دارای ژن *qacA/B* بودند. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط ازمانتر و همکاران در سال ۲۰۱۱ در تونس که نشان دهنده سهم بالای ژن *mecA* و بعد از آن *qacA/B* بود، مشابهت دارد [۲۴]. حضور همزمان ژن‌های *qacA/B* میان‌کننده ارتباط حضور این ژن‌ها با ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین (*mecA*) بود. هورنر در سال ۲۰۱۲ در یک مطالعه مروری وجود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های عامل مقاومت به برخی بیوسیدها را گزارش کرد [۲۵]. در مطالعات لانگتین و همکاران (کانادا-۲۰۰۵)، مک‌گان و همکاران (آمریکا-۲۰۰۳)، والی و همکاران و نوگوچی و همکاران (ژاپن-۱۹۹۲) نبود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و ژن‌های عامل مقاومت به بیوسیدها گزارش شد که با نتایج به دست آمده در این مطالعه همخوانی ندارد. در مطالعات یاد شده فراوانی ژن *smr* بیشتر از *qacA/B* گزارش شده است که از این نظر نیز با مطالعه حاضر که باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شیوع ژن *qacA/B* نسبت به شیوع ژن *smr* بیشتر می‌باشد، همخوانی ندارد [۲۶-۲۸]. ازمانتر و همکاران، لی لاپرن و همکاران و سیدو و همکاران در مطالعات جداگانه‌ای که روی حضور ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و بیوسیدها پرداخته بودند، فراوانی بالای ژن *qacA/B* را نسبت به ژن *smr* گزارش کردند. در نتایج مطالعه حاضر روی باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شیوع ژن *qacA/B* نسبت به شیوع *smr* کمتر می‌باشد [۳۰، ۲۹]. اختلافات موجود در نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با سایر مطالعات داخلی و خارجی را می‌توان به تفاوت سویه‌های باکتریایی با توجه به تفاوت‌های مکانی نسبت داد. حضور بالای این ژن‌ها در نمونه‌های بالینی، به خصوص نمونه‌های خون و ادرار بیان کننده ظهور عفونت‌هایی است که بر پایه استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی استوار بوده که علاوه بر داشتن ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، دارای ژن‌های مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌ها نیز می‌باشد.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این پژوهش، حاکی از شیوع ژن‌هایی است که زمینه مساعدی برای مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های مهم دارند. پژوهش حاضر به عنوان یکی از محدود پژوهش‌های انجام شده در ایران که حضور ژن‌های *qacA/B* و *smr* را در استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی مورد بررسی قرار داده

این موضوع فراوانی استافیلوکوک اپیدرمیدیس را در بین استافیلوکوک‌های کوگولاز منفی نشان می‌دهد که نتایج با مطالعه کوکسال و همکاران مطابقت دارد. این مطالعه که در سال ۲۰۰۹ در ترکیه روی گونه‌های مختلف جنس استافیلوکوکوس انجام شده بود، نشان داد که در بین گونه‌های کوگولاز منفی جنس استافیلوکوکوس دو باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دارای بیشترین فراوانی بوده و بالاترین فراوانی مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس است [۲۰]. از مجموع ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۱۹ جدایه دارای ژن *qacA/B*، ۲۱ جدایه دارای ژن *smr* و ۳۶ جدایه دارای ژن *mecA* بودند. این نتایج با بررسی‌های انجام شده توسط اسکوگارد و همکاران که در سال ۲۰۱۳ در دانمارک انجام شد مشابهت دارد. همچنین در مطالعه حاضر وجود یا عدم وجود ارتباط بین ژن‌های عامل مقاومت به بیوسیدها و مقاومت به متی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفت. با تحلیل داده‌ها و مقادیر *p* value به دست آمده از ژن‌های *smr* (۰/۰۰۵۶) و *qacA/B* (۰/۰۰۱۹) و *mecA* (۰/۰۰۱۳۶) ارتباط معنی داری بین حضور ژن‌های عامل مقاومت به شونیده‌ها و ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین دیده شد. بطوریکه در بیشتر نمونه‌هایی که از نظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند، ژن‌های *qacA/B* و *smr* دیده شد. همچنین مطالعه اسکوگارد و همکاران نشان داد که جدایه‌هایی که از نظر حضور ژن‌های *qacA/B* و *smr* مثبت بودند، از نظر مقاومت به پنی‌سیلین، سفوکسیتین و اریترومایسین دارای بالاترین فراوانی هستند [۲۱]. بیشترین میزان فراوانی ژن‌های *mecA*، *qacA/B* و *smr* در نمونه‌های بالینی به دست آمده از ادرار و زخم بود که از این نظر با مطالعه انجام گرفته توسط مختاریان و همکاران در گناباد که در سال ۲۰۱۴ روی نمونه‌های ادراری انجام گرفت، مشابه است. در مطالعه مختاریان و همکاران مهمترین عامل مسبب عفونت‌های ادراری در زنان وابسته به کوگولاز منفی‌ها، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بود. همچنین بیشترین و کمترین میزان مقاومت در این گروه متعلق به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و ونکومایسین گزارش شده است که نزدیک به مطالعه حاضر می‌باشد [۲۲]. مطالعه انجام شده توسط عربستانی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شهر همدان نشان داد که استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در عفونت‌های وابسته به کوگولاز منفی‌ها در زنان بیشترین نقش را داشته و از این دو بیشترین سهم را ساپروفیتیکوس دارد. از طرف دیگر، بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون پنی‌سیلین در این گروه مشاهده شد. همچنین در این مطالعه مقاومت به ونکومایسین در استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دیده نشد که مشابه مطالعه حاضر می‌باشد [۲۳]. از مجموع ۴۹ جدایه

زاهدان و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیته اخلاق ir.zaums.rec.1394.250 می‌باشد و بودجه آن از محل طرح‌های تحقیقاتی تأمین شده است.

تعارض منافع:

نویسندگان مقاله حاضر هیچ گونه تعارض منافع با توجه به تألیف و یا انتشار اعلام نکرده‌اند.

است، ضرورت وجود توجه بیشتر و تحقیق گسترده‌تر در زمینه نوع و همچنین میزان ماده بیوسایدی مصرفی در محصولات بیوسایدی را بیان می‌کند. از سوی دیگر در بررسی حاضر ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به QACs و مقاومت به متی‌سیلین به دست آمد. در نتیجه، حضور هر کدام از این شاخص‌های مقاومت می‌تواند به گزینش مشترک این دو به دنبال درمان آنتی‌بیوتیکی و یا به دنبال مصرف مواد ضد عفونی‌کننده حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیوم منجر شود.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از مسئولین مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی-گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی

References:

- Nawattanapaiboon K, Prombun P, Santanirand P, et al. Hemoculture and Direct Sputum Detection of mecA-Mediated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with a Lateral-Flow Dipstick. *J Clin Lab Anal* 2016; 17(10): 2193-5.
- Siebert WT MN, Williams TW Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *South Med J* 1978;71(11):130-145.
- Gillaspy AF, Iandolo JJ. *Staphylococcus*. In: Schaechter M (eds). *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2009; 11(9):293-303.
- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-Negative *Staphylococci*: Pathogens Associated with Medical Progress. *Clin Infect Dis* 1994;19(2):231-45.
- Makki AR, Sharma S, Duggirala A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of coagulase negative staphylococci (CoNS) other than *Staphylococcus epidermidis* isolated from ocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):9018-22.
- Babaei M, Sulong A, Hamat R, et al. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015;(14):11.190-211.
- Warren DK, Prager M, Munigala S, et al. Prevalence of *qacA/B* Genes and Mupirocin Resistance Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in the Setting of Chlorhexidine Bathing Without Mupirocin. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;8 (11):1-8.
- Noguchi N, Suwa J, Narui 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. *J med microbiol* 2005;54(Pt 6):557-65.
- 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(11):1116-9.
- Teixeira CF, Pereira TB, Miyazaki NH, et al. Widespread distribution of *qacA/B* gene among coagulase-negative *Staphylococcus* spp. in Rio de Janeiro, Brazil. *J Hosp Infect* 2010;75(4):333-4.
- Mc Gann P, Milillo M, Kwak YI, et al. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes *qacA/B* and *mupA* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77(3):270-2.
- Zheng R, Wang M, He B, et al. Identification of active efflux system gene *qacA/B* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its significance. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009;34(6):537-42.
- Antunes AL, Secchi C, Reiter KC, et al. Feasible identification of *Staphylococcus epidermidis* using desferrioxamine and fosfomycin disks. *APMIS* 2008;116(1):16-20.
- Marrie TJ, Kwan C. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus saprophyticus* and urethral staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22(3):395-7.
- Raggi C, Filippini P, Monaco M, et al. Methicillin Resistance, Biofilm Formation and Resistance to Benzalkonium Chloride in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Clin Microbiol* 2013; 2(10):121.135
- Nahaei MR, Shahmohammadi MR, Ebrahimi S, et al. Detection of Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* and Surveillance of Antibacterial Resistance in a Multi-Center Study from Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(8):1994-5.
- Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, et al. Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. *J Clin Microbiol* 2006;44(6):2119-25.

18. Miyazaki NH, Abreu AO, Marin VA et al. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(4):539-40.
19. Nakipoglu Y, Ignak S, Gurler N, et al. The prevalence of antiseptic resistance genes (qacA/B and smr) and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(2):180-9.
20. Koksall F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res* 2009;164(4):404-10.
21. Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, et al. Recently introduced qacA/B genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(10):2226-33.
22. mokhtarian DALUE h, GHARAMANI M, minocean mh, et al. Antibiotic susceptibility pattern of coagulase negative *Staphylococci* isolated from urinary tract infection in Gonabad. *Q Horizon Med Sci* 2014;19(5):1-7. (Persian)
23. Arabestani MR, Mahmoudi H, Alikhani M, et al. Evaluation Prevalence agents of urinary tract infection and antibiotic resistance in patients admitted to hospitals in Hamedan University of Medical Sciences 1391-92. *Pajouhan Sci J* 2014; 12(13): 20-27. (Persian)
24. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, et al. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 2011;4(1):1-9.
25. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother* 2012;67(11):2547-59.
26. 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(6): 2999-3001.
27. 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(11): 1116-9
28. 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(13): 247-53.
29. Leelaporn A, Paulsen IT, Tennent JM, et al. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol* 1994; 40(9): 214-20.
30. 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(11): 2797-803.

The frequency of qacA/B and smr genes in clinical isolates of methicillin resistance coagulase negative staphylococci

Mohammad Bokaeian^{1,2}, Javad Adabi¹, Hamed Tahmasebi*¹

Received: 2016/15/07

Revised: 2016/28/10

Accepted: 2016/8/11

1. Dept Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2. Zahedan Center of Infectious Diseases & Tropical, Zahedan, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.3, Fall 2016

Pars J Med Sci 2016; 14(3):9-18

Abstract

Introduction:

Increasing use of disinfectants biocide cause to appearance of resistant strains of coagulase negative Staphylococcus. Some research confirmed this gene responsible for resistance to methicillin and association with these agents. The aim of this study was to investigate the presence of resistance genes of biocides such as qac A/B and smr in coagulase negative staphylococci.

Materials & Methods:

In this cross-sectional study, 60 samples of Staphylococcus epidermidis and 49 samples of Staphylococcus saprophyticus were collected over 9 months from clinical samples. After the initial biochemical tests and confirmation of genus and species of isolates, specific primers were used to study qacA/B and smr genes through polymerase chain reaction (PCR). Data were analyzed using chi-square test.

Results:

Of 60 isolates of Staphylococcus saprophyticus, 36 isolates (60%) had mecA. Among these, 19 isolates (52.77%) had qacA and 21 isolates (58.33%) had smr. Furthermore, of 49 Staphylococcus epidermidis isolates, 27 isolates (55.1%) had mecA and among those isolates, 11 isolates (22.44%) had qac A/B and 8 isolate (16.32%) had smr.

Conclusions:

The results of our study showed the widespread presence of qac A/B and smr in clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. Given the low frequency of qacA/B and smr in the isolates sensitive to the antibiotics, it is necessary to evaluate antibiotic resistance for treatment of microbial infections.

Keywords: Drug Resistance, Methicillin-Resistant Staphylococcus, qacA/B

* Corresponding author, Email: h.tahmasebi87@yahoo.com