Archive

ORIGINAL ARTICLE

Phenotypic Changes of Oxacillin Resistance in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Strains by Successive Passaging

Mohammad Modoodi Yaghooti[1],
Narjes Noori Goodarzi[1],
Javad Hamedi[2],
Mohammad Azarsa[3],
Mohammadreza Afradi[1],
Rahil Mashhadi[4],
Mohammad Reza Pourmand[5]

[1] MSc in Medical Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Khoy University of Medical Sciences, Khoy, Iran
[4] MSc in Molecular and Cellular Biology, Urology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 9, 2019 ; Accepted March 15, 2020)

Abstract

Background and purpose: Rotational use of antibiotics can decrease antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains. The present study aimed to evaluate the alteration of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain carrying SCC*mec* III cassette in long-term evolutionary experiments in an antibiotic-free medium.

Materials and methods: In a cross-sectional study, 10 MRSA isolates were identified between September to December 2018 by conventional microbiology methods from clinical isolates of a university hospital. Then, SCC*mec* typing was carried out using Multiplex PCR. One strain was included in the evolutionary experiment as ancestor and was cultivated for up to 900 generations. Minimum inhibitory concentration (MIC) of oxacillin of the evolved strains was evaluated. The selected strains were compared with the ancestral strain in terms of growth characteristics such as generation time and competitive cultivation.

Results: Out of ten MRSA isolates, six and four were found to harbor SCC*mec* type III and SCC*mec* type IV, respectively. One strain with SCC*mec* III was randomly selected as ancestral strain. The ancestor was resistant to oxacillin while the evolved strains were susceptible. Generation times in the evolved strains were 6-8 minutes shorter than those in the ancestral strain. The evolved strains, with the ratio of 1% in competition experiment, accounted for 20-48% of the final population.

Conclusion: Compared to the ancestor, the evolved strains presented higher fitness in the oxacillin-free environment. The current study indicates the powerful effect of antibiotic rotation strategy on reducing methicillin resistant MRSA.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, reversibility, SCC*mec*

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 23-32 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammad Reza Pourmand1-** School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: mpourmand@tums.ac.ir)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 185 خرداد سال 1399 (32-23)

ارزیابی تغییرات فنوتیپی مقاومت به اگزاسیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در کشت های متوالی

محمد مودودی یاقوتی[1]
نرجس نوری گودرزی[1]
جواد حامدی[2]
محمد آذرسا[3]
محمدرضا افرادی[1]
راحیل مشهدی[4]
محمدرضا پورمند[5]

چکیده

سابقه و هدف: مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان می‌تواند موجب کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به استافیلوکوکوس اورئوس شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات مقاومت به اگزاسیلین در سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) حامل کاست کروموزومی SCC*mec* III در آزمایش‌های تکاملی متوالی در محیط کشت عاری از آنتی‌بیوتیک بود.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مقطعی از شهریورماه تا آذرماه سال 1397 تعداد 10 جدایه MRSA از نمونه های بالینی بیماران بخش‌های یک بیمارستان دانشگاهی به کمک روش‌های رایج میکروب‌شناسی شناسایی شدند. سپس تایپینگ SCC*mec* به روش Multiplex PCR بر روی آن‌ها انجام شد. یک سویه به عنوان سویه نیا وارد آزمایش‌های تکاملی شد و تا حدود 900 نسل کشت داده شد. پس از تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) اگزاسیلین ویژگی‌های رشد مانند زمان تکثیر (Generation time) و کشت‌های رقابتی سه سویه انتخابی با سویه نیا، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از 10 جدایه بالینی MRSA، 6 سویه با ویژگی SCC*mec* تایپ III و 4 سویه با ویژگی SCC*mec* تایپ IV مشخص گردید. سویه نیا نسبت به اگزاسیلین مقاوم و سویه‌های تکامل یافته حساس بودند. نتایج زمان تکثیر در سه سویه تکامل یافته با 8-6 دقیقه کاهش همراه بود. جمعیت سویه‌های تکامل یافته از 1 درصد، در انتها به 20 تا 48 درصد از جمعیت کل افزایش یافت.

استنتاج: سویه‌های تکامل یافته نسبت به سویه نیا صلاحیت رشد بالاتری در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک پیدا کردند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تاثیر مثبت راهبرد مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک بر کاهش سویه‌های MRSA است.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، برگشت پذیری، SCC*mec*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس عامل مهم بیماریزای انسانی است و مقاومت آن در برابر طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در طی دهه های گذشته افزایش یافته است. این پاتوژن طیف وسیعی از عفونت‌های اکتسابی

مولف مسئول: محمدرضا پورمند: تهران، خ پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت E-mail: mpourmand@tums.ac.ir
1. کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
2. استاد، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران
3. استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی خوی، خوی، ایران
4 کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
5. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1398/7/17 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/7/20 تاریخ تصویب : 1398/12/25

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

از جامعه و بیمارستان ایجاد می‌کند. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، در مقایسه با سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین (MSSA) دارای عوارض شدیدتر و میزان مرگ و میر بالاتری می‌باشد(2،1). پیش از کشف و استفاده از پنی‌سیلین، 80 درصد عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* منجر به مرگ می‌شد(3). در اوایل دهه 1940 میلادی میزان مرگ و میر ناشی از این پاتوژن با استفاده از پنی‌سیلین G به طور چشمگیری کاهش یافت. اما سویه‌های مقاوم به سرعت در سال 1942 ظاهر شدند، به طوری که در حال حاضر بیش از 90 درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به پنی‌سیلین مقاوم هستند(4). در اوایل عصر آنتی‌بیوتیک، *استافیلوکوکوس اورئوس* تقریباً به همه کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی حساس بود. با این حال با گذشت زمان، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شدند و در دهه 1960 کلون‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین ظهور پیدا کردند(5). شاید بتوان این پاتوژن را الگوی تکامل و تطابق باکتری‌ها با شرایط اکولوژیک جدید در عصر مصرف بالای آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار آورد. بطوری که تقریبا مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در نیم قرن گذشته در این باکتری مشاهده می‌شود.

کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری، با هزینه‌های فیزیولوژیک بسیاری همراه است. ویژگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باعث حفظ و بقای باکتری در حضور آنتی‌بیوتیک می‌شود، اما در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک باعث کاهش صلاحیت باکتری و کاهش سرعت رشد در مقایسه با سویه‌های وحشی حساس خواهد شد. شرایط محیطی به نفع میکروارگانیسمی خواهد بود که بتواند به طور بهینه‌تر از منابع انرژی موجود استفاده کند. توانایی میکروارگانیسم برای زنده ماندن و تکثیر در هر محیط تحت عنوان شایستگی (Fitness) آن سویه تعریف می‌شود. هرچه یک سویه توانایی رشد و تکثیر بالاتری در یک محیط داشته باشد، به همان اندازه شایستگی بالاتری دارد(7،6). طبق نظریه انتخاب طبیعی در یک جمعیت، ژنوتیپی غالب خواهد شد که دارای توانایی بالاتر برای زندگی در آن محیط باشد. در محیط میکروبی نیز، میکروب‌ها جهت حفظ جمعیت خود در حال رقابت می‌باشند که فاکتور اصلی انتخابی آن‌ها شایستگی باکتری می‌باشد. بنابراین میکروارگانیسمی تکامل خواهد یافت که صفات غیر ضروری خود را جهت افزایش شایستگی تغییر دهد. مقدار هزینه و انرژی مصرفی برای هر صفت مقاومت باکتری با عنوان هزینه شایستگی (Fitness Cost) بیان می‌شود(8). در مطالعات بسیاری مشاهده شده است که کسب مقاومت آنتی بیوتیکی برای ارگانیسم هزینه شایستگی به همراه داشته و بار اضافه ای بر ارگانیسم تحمیل می‌کند و باعث کاهش سرعت رشد باکتری می‌شود(9)، به گونه‌ای که شایستگی سویه مقاوم کاهش یافته و ممکن است سویه‌های حساس در رقابت برای رشد در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک بر سویه مقاوم پیروز گردند(10).

یکی از رویکردهای معرفی شده جهت کنترل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک یا Drug rotation است. مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک به منزله حذف و محدود کردن تجویز یک کلاس از آنتی‌بیوتیک‌ها در یک بازه زمانی مشخص می‌باشد. مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله راهبردهای کاهش میزان مقاومت در بیمارستان‌ها می‌باشد که با توجه به تفاوت صلاحیت سویه‌های مقاوم و حساس طراحی می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد یک فشار انتخابی و انتخاب کلون‌های مقاوم در محیط رشد میکروبی می‌گردند. در صورت کاهش مصرف یک آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های دارای شایستگی بیش‌تر بر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک غالب می‌شوند و بنابراین شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی کاهش می‌یابد(11). در نتیجه حذف و کاهش تجویز یک آنتی‌بیوتیک ممکن است منجر به موثر واقع شدن همان آنتی‌بیوتیک در آینده شود(12).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

آزمایش‌های تکاملی بلند مدت، یکی از روش‌های آزمایشگاهی است که برای بررسی تکامل و تطبیق در جمعیت‌های میکروبی در شرایط مشخص نظیر حضور یا عدم حضور عوامل آنتی‌میکروبیال انجام می‌شود(13). در این آزمایش‌ها در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک، سویه‌های مقاوم تکامل می‌یابند و فنوتیپ‌های جدید ایجاد می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی برگشت‌پذیری مقاومت به اگزاسیلین در سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حامل SCC*mec* III در آزمایش‌های تکاملی متوالی در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

در یک مطالعه مقطعی از شهریورماه تا آذرماه سال 1397 تعداد 10 جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه‌های کشت خون، زخم و... بیماران بستری در بخش‌های یک بیمارستان دانشگاهی به کمک روش‌های رایج میکروب‌شناسی (نظیر رنگ آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول بر روی محیط مانیتول سالت آگار و آزمون حساسیت به دیسک سفوکسیتین) جدا سازی شدند(14). از سویه COL به عنوان استاندارد MRSA استفاده شد. پس از تعیین هویت، تایپینگ SCC*mec* بر روی جدایه‌های MRSA انجام گرفت.

تعیین تایپ SCCmec

استخراج ژنوم از سویه‌های MRSA بر طبق دستورالعمل کیت Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Catalog Number 11796828001) با اضافه کردن 5 میکرولیتر لیزوزیم (10 mM Tris-HCl ; pH 8.0) انجام پذیرفت. از ژنوم استخراج شده برای واکنش‌های multiplex-PCR استفاده گردید. برای تعیین تایپ SCCmec دو واکنش M-PCR1 و M-PCR2 انجام شد که در M-PCR1 از یک جفت پرایمر برای شناسایی mecA و 3 جفت پرایمر برای شناسایی ژن‌های ccr (جدول شماره 1) و در واکنش M-PCR2 از 4 جفت پرایمر برای شناسایی mec gene complex A و mec gene complex B (جدول شماره 2) استفاده شد(15).

جدول شماره 1: پرایمرهای استفاده شده در واکنش M-PCR1

توالی پرایمر	جایگاه اتصال	سایز محصول (جفت باز)
F: 5' TGCTATCCACCCTCAAACAGG 3' R: 5' AACGTTGTAACCACCCCAAGA 3'	*mecA*	286
F: 5' AACCTATATCATCAATCAGTACGT 3' R: 5' ATTGCCTTGATAATAGCCITCT 3'	*ccrA1B1*	695
F: 5' AAAGGCATCAATGCACAAACACT 3' R: 5' ATTGCCTTGATAATAGCCITCT 3'	*ccrA2B2*	937
F: 5' AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT 3' R: 5' ATTGCCTTGATAATAGCCITCT 3'	*ccrA3B3*	1791

جدول شماره 2: پرایمرهای استفاده شده در واکنش M-PCR2

توالی پرایمر	جایگاه اتصال	سایز محصول (جفت باز)
F: 5' ATATACCAAACCCGACAACTACA 3' R: 5' CATAACTTCCCATTCTGCAGATG 3'	ClassA *mec* gene complex	1965
F: 5' ATATACCAAACCCGACAACTACA 3' R: 5' ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG 3'	ClassB *mec* gene complex	2827
F: 5' ATATACCAAACCCGACAACTACA 3' R: 5' TGAGGTTATTCAGATATTTCGATGT 3'	ClassC *mec* gene complex	804

ترسیم منحنی رشد

جهت به دست آوردن منحنی رشد، جمعیت باکتری‌ها در زمان‌های متوالی مشخص اندازه‌گیری شد. منحنی رشد با استفاده از لگاریتم تعداد باکتری‌های زنده در واحد زمان رسم گردید. برای این منظور از کشت شبانه در محیط کشت BHI-agar، سوسپانسیون با کدورت برابر با استاندارد 0/5 مک فارلند تهیه شد. سپس در یک فلاسک 200 میلی‌لیتری حاوی 100ml محیط کشت BHI-broth، 500µl از سوسپانسیون اولیه تلقیح و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با دور 200 در دقیقه در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید. در زمان‌های صفر تا 13 ساعت OD (optical density) در طول موج 600nm در کووت‌های 1 میلی‌لیتری در اسپکتروفتومتر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

تعیین و ثبت شد. همچنین جمعیت باکتری‌های زنده به صورت cfu/ml اندازه‌گیری گردید. نمونه‌های غلیظ‌تر جهت عبور نکردن از محدوده خطی اسپکتروفتومتر رقیق شدند و سپس OD در عدد عکس رقت ضرب شد. جهت اندازه‌گیری cfu/ml در هر مرحله محیط کشت در رقت‌های 1:1، 1:10، 1:100، 1:1000، 1:10000 و 1:100000 در سرم فیزیولوژی تهیه و سپس 10µl از هر رقت در محیط BHI-agar کشت داده شد. نقطه mid-log از منحنی رشد به عنوان فواصل زمانی در کشت‌های متوالی تکاملی در نظر گرفته شد. زمان تکثیر با استفاده از فاز لگاریتمی منحنی‌های رشد محاسبه گردید (جدول شماره 3)(16).

جدول شماره 3: زمان تکثیر در سویه نیا و سویه های تکامل یافته

سویه	زمان تکثیر
A	44 دقیقه و 46 ثانیه
E1	38 دقیقه و 52 ثانیه
E2	36 دقیقه 46 ثانیه
E3	36 دقیقه و 35 ثانیه

کشت های متوالی تکاملی

سویه MRSA مورد نظر بر روی BHI-agar به صورت شبانه کشت داده شد و یک کلنی به‌عنوان سویه نیا انتخاب گردید. از این سویه سوسپانسیون با کدورت برابر با استاندارد 0/5مک فارلند تهیه شد. آزمایش تکاملی در 5 خط کشت متوالی انجام شد. در پنج فلاسک 50ml حاوی 5ml محیط کشت BHI-broth با 25µl از این سوسپانسیون تلقیح و در انکوباتور شیکر دار با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 200 دور در دقیقه انکوبه شد. هر 8 ساعت مقدار 25µl از این فلاسک به فلاسک جدید با همان شرایط پاساژ داده شد. این شرایط تضمین رشد در فاز لگاریتمی برای هر فاصله زمانی 8 ساعت را مهیا می‌کند. بعد از 30 روز از 90 کشت متوالی فلاسک‌های نهایی بر روی پلیت BHI-agar کشت و یک کلنی به عنوان سویه‌های تکامل یافته (evolved) در نظر گرفته شد(E1-E2-E3-E4-E5). در هر پاساژ 1ml از نمونه‌ها با 0/3ml گلیسرول ذخیره و در دمای 80- درجه سانتی گراد نگهداری شد(19-17).

تست های رقابتی بین سویه نیا و سویه‌های تکامل یافته

برای تست بررسی رقابت بین سویه نیا و سویه‌های تکامل یافته، جمعیت سویه نیا با هر یک از سویه‌های تکامل یافته حاصل از کشت‌های متوالی تکاملی به صورت جداگانه مخلوط شد. بدین‌جهت جمعیت سویه نیا و هر یک از سویه‌های تکامل یافته با نسبت 100 به 1 در یک فلاسک با 5ml محیط BHI-broth تلقیح گردید. پس از 2 کشت متوالی با شرایط کشت‌های متوالی تکاملی، نسبت دو جمعیت باکتری نیا و تکامل یافته با کشت بر روی محیط‌های BHI-agar و BHI-agar دارای 4µg/ml اگزاسیلین محاسبه گردید(20).

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

حداقل غلظت مهاری (MIC) آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین برای سویه نیا و سویه‌های تکامل یافته به روش MIC Test Strips با نوارهای اگزاسیلین (Liofilchem, Italy) بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت. داده‌ها براساس CLSI تفسیر گردید(21).

یافته ها

پس از تعیین تایپ ده جدایه MRSA، جدایه‌ای با ویژگی III SCC*mec* به عنوان سویه نیا انتخاب گردید. SCC*mec* این سویه دارای *mec* gene complex A و *ccrAB3* بود که تصاویر شماره 1 و 2 الگوی الکتروفورز برای واکنش‌های M-PCR1 و M-PCR2 را به ترتیب نشان می‌دهد.

کشت های متوالی تکاملی

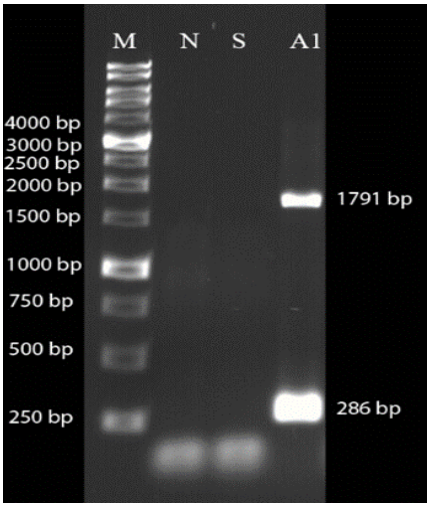
پس از کشت سویه فوق منحنی رشد برای سویه نیا (A1) رسم گردید (تصویر شماره 3). در تصویر شماره 3 نقطه mid-log و زمان تکثیر مشخص شده است . پنج

www.SID.ir

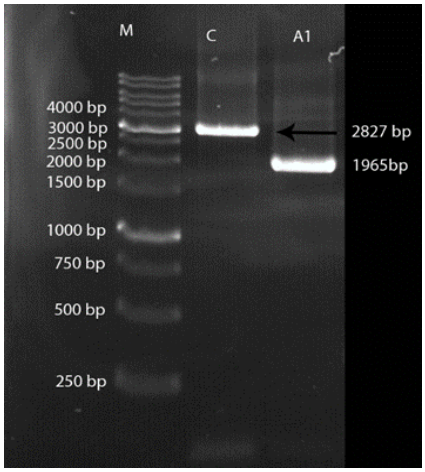
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

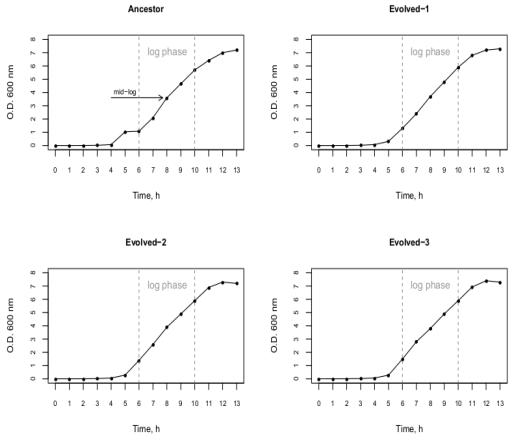
دودمان به طور مستقل تا حدود 900 نسل تکثیر یافتند. در نودمین کشت هر کدام از 5 دودمان کشت روی محیط BHI-agar کشت داده شدند و در هریک از جمعیت‌های تکامل یافته یک کلنی به عنوان سویه تکامل یافته انتخاب گردید (E1-5). منحنی رشد برای سویه‌های تکامل یافته به مانند سویه نیا ترسیم شد. همچنین زمان تکثیر برای سویه‌های تکامل یافته محاسبه گردید (جدول شماره 3). با توجه به جدول تمامی سویه‌های تکامل یافته، کاهش در زمان تکثیر را نشان می‌دهند. نتایج MIC اگزاسیلین نیز برای سویه‌های نیا و تکامل یافته در جدول نشان داده شده است. با توجه به این‌که تمامی سویه‌های تکامل یافته MIC کم‌تر از 2µg/ml را نشان دادند، همگی سویه‌های تکامل یافته در دسته حساس به متی‌سیلین قرار گرفتند. در ادامه از 5 سویه تکامل یافته، 3 سویه که دارای MIC نزدیک‌تر بودند جهت آزمایش‌های رقابتی با سویه نیا انتخاب شدند.



تصویر شماره 1: ژل الکتروفورز محصول M-PCR1 در شرایط غلظت آگارز 0.8 درصد، ولتاژ 85 ولت، زمان 45 دقیقه. M، مارکر سایز مولکولی. N، نمونه ی کنترل بدون دی ان ای. S، نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین. A1، سویه ی مورد آزمون، که دو باند مشاهده شده از بالا به پایین به ترتیب *ccrAB3* و *mecA* می‌باشد.



تصویر شماره 2: ژل الکتروفورز محصول M-PCR2 در شرایط غلظت آگارز 0.8 درصد، ولتاژ 85 ولت، زمان 45 دقیقه. M، مارکر سایز مولکولی. C، سویه ی COL، که باند حاصل محصول 2827 جفت بازی mec gene complex B می باشد. A1، باند حاصل محصول mec gene complex A می باشد



تصویر شماره 3: منحنی رشد سویه نیا (Ancestor) و سویه های تکامل یافته (Evolved 1-3)

تست های رقابتی بین سویه‌های تکامل یافته و سویه نیا

رقابت رشد بین جمعیت‌های سویه نیا با هریک از سویه‌های تکامل یافته مشاهده و ثبت گردید. نتیجه این رقابت در محیط کشت BHI آگار فاقد اگزاسیلین و محیط کشت BHI آگار حاوی اگزاسیلین در جدول شماره 4 آورده شد. در این جدول سه سویه تکامل یافته منتخب که به نسبت 1 درصد از سویه نیا وارد کشت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

رقابتی شدند، 47/6 درصد و کل جمعیت میکروبی را به خود اختصاص دادند.

جدول شماره 4: نتایج کشت رقابتی سویه‌های تکامل یافته منتخب E1,E2,E3 و سویه نیا A1

سویه تکامل یافته	نسبت تعداد سویه نیا به سویه تکامل یافته در زمان صفر	تعداد کل باکتری ها (cfu/ml) در محیط BHI پس از 16 ساعت کشت	تعداد کل باکتری ها (cfu/ml) در محیط BHI-Oxacillin پس از 16 ساعت کشت
E1	$\frac{40\times10^{7}}{40\times10^{7}}$	23×10^{8}	12×10^{8}
E2	$\frac{40\times10^{7}}{40\times10^{7}}$	23×10^{8}	15×10^{8}
E3	$\frac{40\times10^{7}}{40\times10^{7}}$	25×10^{8}	20×10^{8}

بحث

در مطالعه حاضر تغییرات مقاومت به اگزاسیلین در سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین حامل کاست کروموزومی SCC*mec* III در آزمایش‌های تکاملی متوالی در محیط کشت عاری از آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مرگ‌ومیر ناشی از عفونت‌های MRSA در سال‌های اخیر رو به افزایش است. شیوع این سویه‌ها در ایران از 34/6 درصد بین سال‌های 2009 تا 2012 به 56 درصد بین سال‌های 2013 تا 2016 افزایش یافته است. افزایش شیوع MRSA در سال‌های اخیر در کشور نمایانگر نیاز به اقدامات موثر در مقابله با این سویه‌ها می‌باشد(22). سویه MSSA با کسب یک کاست کروموزومی حامل ژن *mec*A به یک سویه مقاوم به متی‌سیلین تبدیل می‌شود(23). تا کنون 13 تایپ ژنتیکی SCC*mec* کشف و مورد تایید کارگروه بین المللی طبقه‌بندی کاست‌های کروموزومی استافیلوکوکوسی (IWG-SCC) قرار گرفته است(24). این تایپ‌ها از نظر پراکندگی در بین سویه‌های MRSA، الگوی تقریبا مشخصی دارند. به طوری‌که بررسی‌ها نشان داده است سویه‌های بیمارستانی (HA-MRSA) بیش‌تر در تایپ‌های I، II و III و سویه‌های اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) بیش‌تر در تایپ‌های IV، V و VII قرار می‌گیرند(15). علاوه بر این، پراکندگی ژنتیکی تایپ‌های SCC*mec* از نظر منطقه جغرافیایی جهانی نیز می‌تواند متفاوت باشد. به عنوان مثال واریانت غالب در کشور سوئیس IV و V(25)، در ژاپن IIa (26) و در ایران III (27) می‌باشد. در کشور ما گزارش‌های متعددی از وضعیت پراکندگی این تایپ‌ها منتشر شده است، به عنوان نمونه در مطالعه افشاری و همکاران در سال 2017، 71/4 درصد سویه‌های MRSA دارای تایپ III و 28/6 درصد دارای تایپ IV بودند(28). در گزارش دیگری توسط اوحدیان و همکاران در سال 2015، از میان 135 نمونه مورد بررسی، 55/8 درصد سویه‌های MRSA دارای کاست تایپ III بودند(27).

در مطالعه دیگری موسویان و همکاران با بررسی 29 جدایه از بیمارستان‌های امام خمینی و گلستان اهواز، کاست تایپ III را با 55/17 درصد شایع‌ترین تایپ گزارش کرده‌اند(29). این گزارش‌ها نشان دهنده شیوع نسبتا بالای تایپ III در ایران می‌باشند. با توجه به غالب بودن تایپ III در مطالعه حاضر و سایر پژوهش‌های پیشین در ایران، یک سویه دارای تایپ III به عنوان سویه نیا انتخاب گردید.

در مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک فرض بر این می‌باشد که با حذف یک آنتی‌بیوتیک سویه‌های حساس با غلبه بر سویه‌های مقاوم، باعث جایگزینی و غالب شدن جمعیت خود می‌شوند. تکامل و انتخاب اصلح در محیط میکروبی عامل محرک اصلی آن می‌باشد(30). در این مطالعه امکان برگشت پذیری مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفت. پنج نمونه کشت انتهایی از نظر مقدار حداقل غلظت مهاری اگزاسیلین که نماینده‌ای از مقاومت به متی سیلین می‌باشد، در بازه حساس قرار گرفتند. مشابه با این مطالعه، در مطالعه گلدر و همکاران تاثیر محیط عاری از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بر روی باکتری اشریشیا کلی در کشت‌های متوالی مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش آن ها سویه‌های اشریشیا کلی انتهایی نسبت به تتراسایکلین حساس شدند(20).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

درمطالعه حاضر کاهش زمان تکثیر(Generation Time) در *سویه‌های* تکامل یافته می‌تواند این مسئله را توجیه کند که احتمالا ژن‌های مقاوم به متی‌سیلین از نظر مصرف انرژی و هزینه برای باکتری مقرون به صرفه نمی‌باشد. از طرفی افزایش جمعیت سویه‌های حساس به سویه نیا در کشت‌های رقابتی می‌تواند تاییدی بر این مسئله باشد. سویه‌های حساس در طی زمان می‌توانند منجر به حذف جمعیت مقاوم شوند.

در مطالعه‌ای دیگر بر روی اشریشیا کلی با مقاومت سطح بالای استرپتومایسین که همراه با موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن *rpsL* بود، کاهش شایستگی باکتری در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک نسبت به سویه‌های وحشی گزارش شد. در توجیه این موضوع گزارش گردید که کاهش سرعت در مرحله طویل سازی (elongation) در ترجمه پروتئین علت این مسئله می‌باشد(31). در مطالعه‌ای دیگر علت کاهش شایستگی در کسب پلاسمیدهای حامل ژن‌های مقاومت، ایجاد فشار اضافی بر باکتری در همانندسازی پلاسمید و بیان ژن‌های آن ها بیان شده است(32). تمامی این موارد بیانگر این مسئله است که حذف و کاهش آنتی‌بیوتیک در محیط می‌تواند باعث کاهش سویه‌های مقاوم و جایگزینی سویه‌های حساس در جمعیت شود. تغییرات ژنتیکی به وجود آمده در سویه نیا در این پژوهش می‌تواند دلیلی بر این موضوع باشد که SCC*mec* همانند مطالعاتی که عنوان شد فشار قابل ملاحظه‌ای بر باکتری وارد می‌کند. با حضور ژن *mec*A و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شایستگی باکتری جهت رشد در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک کاهش می‌یابد. بنابراین در رقابت بین سویه‌های حساس و مقاوم، سویه‌های فاقد ژن‌های مقاومت شایستگی بیش‌تری برای رشد در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک خواهند داشت که این مسئله در فاکتورهایی نظیر زمان تکثیر و کشت‌های رقابتی نمود پیدا کرد.

در مطالعه حاضر برگشت‌پذیری مقاومت به متی‌سیلین به روش فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت. توصیه می‌شود در مطالعات آتی این تغییرات با استفاده از روش‌هایی نظیر Whole Genome Sequencing صورت گیرد.

سویه‌های تکامل یافته نسبت به سویه نیا صلاحیت رشد بالاتری در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک پیدا کردند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده تاثیر مثبت راهبرد مصرف چرخشی آنتی‌بیوتیک بر کاهش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین است. این مسئله می‌تواند نشان دهنده تاثیر احتمالی حذف آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین در بالین بر کاهش شیوع سویه‌های MRSA باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی و طرح تحقیقاتی 35224 و با کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1396.2903 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

References

1. Sadeghi Y, Salami SA, Kananizadeh P, Mozhgani SH, Pourmand MR. Real-time PCR followed by high-resolution melting analysis–a new robust approach to evaluate Sccmec typing of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Future Microbiol 2019; 14(2): 155-164.
2. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta Med Iran 2014; 52(6): 424-429.
3. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

EE. The molecular evolution of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2007; 13(3): 222-235.

4. Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococcus aureus. Annu Rev Biochem 2015; 84(1): 577-601.
5. Pourramezan N, Moghadam SO, Pourmand MR. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus tracking spread among health-care workers and hospitalized patients in critical wards at a university hospital, tehran, Iran . New Microbes New Infect 2019; 27: 29-35.
6. Marvasi M, Choudhury M, Vala NB, Teplitski M. Fitness of antibiotic-resistant bacteria in the environment: a laboratory activity. J Microbiol Biol Educ 2017; 18(1). pii18.1.15.
7. Pope CF, McHugh TD, Gillespie SH. Methods to determine fitness in bacteria. 2th ed. Antibiotic Resistance Protocols: Springer 2010: 642. 113-121.
8. Wiser MJ, Lenski RE. A comparison of methods to measure fitness in Escherichia coli. Plos One 2015; 10(5): e0126210.
9. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol 2010; 8(4): 260-271.
10. Hernando-Amado S, Sanz-García F, Blanco P, Martínez JL. Fitness costs associated with the acquisition of antibiotic resistance. Essays Biochem 2017; 61(1): 37-48.
11. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Curr Opin Microbiol 2006; 9(5): 461-465.
12. Roemhild R, Schulenburg H. Evolutionary ecology meets the antibiotic crisis: Can we control pathogen adaptation through sequential therapy? Evol Med Public Health 2019; 2019(1): 37-45.
13. Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution–principles and applications for biotechnology. Microb Cell Fact 2013; 12(1): 64.
14. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of Staphylococcus aureus biofilm formation in urinary tract infection. Iran J Public Health 2016; 45(4): 485-493.
15. Ji Y. Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) protocols. 2th ed: Springer 2007:1085.
16. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10th ed: Prentice hall .Upper Saddle River, NJ. Harlow 1997.
17. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, et al. In vitro serial passage of staphylococcus aureus: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. J Bacteriol 2002; 184(5): 1430-1437.
18. Elena SF, Wilke CO, Ofria C, Lenski RE. Effects of population size and mutation rate on the evolution of mutational robustness. Evolution 2007; 61(3): 666-674.
19. Abdo Z, Stein M, Wojtowicz A, Pepin KM. The ABCs of Experimental Evolution. ISRN Comput Biol 2013; 2013.
20. De Gelder L, Ponciano JM, Abdo Z, Joyce P, Forney LJ, Top EM. Combining mathematical models and statistical methods to understand and predict the dynamics of antibiotic-sensitive mutants in a population of resistant bacteria during experimental evolution. Genetics 2004; 168(3):1131-1144.
21. Performance Standards for Antimicrobil Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne PA: Clinikal and Laboratory Standards Institute 2019: 39(1).
22. Dadashi M, Nasiri MJ, Fallah F, Owlia P, Hajikhani B, Emaneini M, et al. Methicillin-

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:02 +0430 on Sunday July 5th 2020

resistant staphylococcus aureus (MRSA) in Iran: a systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist 2018; 12: 96-103.

23. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant staphylococcus aureus N315. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(6): 1449-1458.
24. Johnston PR, Dobson AJ, Rolff J. Genomic signatures of experimental adaptation to antimicrobial peptides in staphylococcus aureus. G3 (Bethesda) 2016; 6(6):1535-1539.
25. Valsesia G, Rossi M, Bertschy S, Pfyffer GE. Emergence of sccmec type iv and sccmec type v methicillin-resistant staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? Journal of Clinical Microbiology 2010; 48(3):720-727.
26. Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Shinagawa M, Takahashi S, et al. Clonal diversity and genetic characteristics of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates from a tertiary care hospital in japan. Microbial Drug Resistance 2019; 25(8): 1164-1175.
27. Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Mahmoudi M, Sadighian H. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: characterization of major clones and emergence of epidemic clones of sequence type (ST) 36 and ST 121 in Tehran, Iran. FEMS Microbiol Lett 2015; 362(8): fnv043.
28. Ghaderi Afshari S, Akhavan Sepahi A, Goudarzi H, Satarzadeh Tabrizi M, Goudarzi M, Hajikhani B, et al. Distribution of sccmec types in methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from burn patients. Arch Clin Infect Dis 2017; 12(2): e62760.
29. Moosavian M, Shahin M, Navidifar T, Torabipour M. Typing of staphylococcal cassette chromosome mec encoding methicillin resistance in staphylococcus aureus isolates in ahvaz, Iran. New Microbes New Infect 2017; 21: 90-94.
30. Merz LR, Warren DK, Kollef MH, Fraser VJ. Effects of an antibiotic cycling program on antibiotic prescribing practices in an intensive care unit. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(8): 2861-2865.
31. Schrag SJ, Perrot V. Reducing antibiotic resistance. Nature 1996; 381(6578): 120-121.
32. Brill WJ. Safety concerns and genetic engineering in agriculture. Science 1985; 227(4685): 381-384.

www.SID.ir