مقاله پژوهشی

بررسی فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین (*mec-A*) در سویه های مختلف استافیلوکوک اورئوس با PCR و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن

دکتر علیرضا زمانی * ، دکتر سیاوش صادقیان** ، دکتر محمد نجفی مصلح*** ، دکتر محمدتقی گودرزی****
دکتر رسول یوسفی مشعوف** ، جلال قادرخانی*****

دریافت : ۸۵/۹/۱۴ ، پذیرش : ۸۶/۳/۲۱

چکیده:

مقدمه وهدف: استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین یک پاتوژن عمده و مهم در ایجاد بیماری و مرگ و میر در ایران و جهان است. به دلیل شیوع روز افزون مقاومت به اغلب آنتی بیوتیک های رایج، درمان و مبارزه علیه آن بسیار مشکل شده است. بنابراین هدف این مطالعه تعیین فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین و بررسی الگوی حساسیت ضد میکروبی سویه های مختلف استافیلوکوک می باشد.

روش کار: این پژوهش توصیفی در سال ۱۳۸٤ بر روی ۷۰ مورد استافیلوکوک اورئوس جداسازی شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان و یک آزمایشگاه خصوصی با تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز(PCR) صورت گرفت. در کنار آن سنجش حساسیت ضد میکروبی ایزوله ها به روش دیسک آگار دیفیوژن انجام و اطلاعات بدست آمده تجزیه و تحلیل گردیدند.

نتایج: یافته های این بررسی به روش PCR نشان داد که از ۷۰ ایزوله بدست آمده، ۵۰ درصد سویه ها (۳۵مورد) ژن مقاومت به متی سیلین را نشان می دهند. ولی در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن، فقط ۳۱/٤ درصد سویه ها (۲۲ مورد) مقاومت به متی سیلین/ اگزاسیلین را نشان می دادند. مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در میان سویه های مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیکهای دیگر نیز همانند پنی سیلین (۱۰۰٪)، کلوگزاسیلین(۹۱/٤٪)، تتراسایکلین(۷٤/۲٪)، کوتریموکسازول(۶۸/۵٪)، اریترومایسین(۶۸/۵٪) و سفتازیدیم(۵۱/٤٪) مشاهده گردید. در مقابل، سویه های استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین به جز پنی سیلین (مقاومت کامل)، حساسیت ضد میکروبی بالای ۸۰ درصد را نسبت به پانل آنتی بیوتیکی نشان می دادند.

نتیجه نهایی: نتایج این پژوهش نشان داد که بروز سویه های مقاوم به متی سیلین در مراکز درمانی همدان به سطح ۵۰ درصد رسیده است که علاوه بر آن مقاومت چند داروئی نیز نشان می دهند.

کلید واژه ها : استافیلوکوك طلائي / ژن مقاومت به متي سيلين / متي سيلين / واكنش زنجيره پليمراز

* استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (zamanialireza@yahoo.com)
** دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** استاد گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

[Downloaded from sjh.umsha.ac.ir on 2023-12-03]

مقدمه :

در سال ۱۹۶۱ اولین سویه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus=MRSA) در اروپا شناسایی شد. از آن زمان تاکنون و به ویژه طی دو دهه گذشته شیوع این سویه در بسیاری از قسمت های جهان افزایش یافته است(۱). این سویه علاوه بر اینکه یکی از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی می باشد به بسیاری از آنتی بیوتیکها، ازجمله بتا لاکتام ها، پنی سیلین های نیمه سنتتیک، سفالوسپورین ها، کارباپنم ها و پنم ها مقاومت نشان می دهد. لذا مهم است که بدانیم عفونت های ناشی از MRSA با اهمیت بوده و می توانند حتی باعث مرگ بیماران مبتلا شوند. بنابراین افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی یک نگرانی محسوب شده و باید همیشه کنترل گردد. مقاومت به متی سیلین مستقل از تولید آنزیم بتا لاکتاماز بوده و شیوع آن در کشور ها و زمان های مختلف متفاوت است. نتایج بررسی ها حاکی از آنند که هر سال سویه MRSA در سرتا سر جهان افزایش می یابد(۲). طبق آمار درآمریکا عفونت های نازوفارنژ ایجاد شده توسط MRSA از ۱۴/۳٪ در سال ۱۹۸۷ به۳۹/۷٪ در سال ۱۹۹۷ افزایش پیدا کرده است(۳). یک بررسی دیگر در همین کشور افزایش MRSA را در بیمارستانها از ۲۴٪ در سال ۱۹۷۴ به ۵۰٪ در سال ۱۹۹۷ نشان می دهد(۴). بررسی ها در سایر نقاط جهان نیز نشان از افزایش سال به سال این سویه دارند. برای مثال در تحقیقی که در سال ۲۰۰۱ در کانادا صورت گرفت از ۳۰۹ ایزوله بالینی، ۲۱۳ مورد سویه MRSA (۶۸/۹٪) و بقیه سویه استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین (Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus=MSSA) تشخیص داده شدند(۵). در انگلستان در سال ۱۹۹۹ با روش PCR، ۴۴ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرارگرفتندکه ۲۱ مورد ژن مقاومت به متی سیلین را نشان دادند(۶). بررسی ها در هنگ کنگ و استرالیا نیز روند مشابهی را نشان دادند(۲،۷).

سویه MRSA دارای ژن مقاوت به متی سیلین (ژن mec-A) است. این ژن پروتئینی به نام PBP2a (پروتئین های باند شونده به پنی سیلین) را کد می نماید که میل ترکیبی آن در اتصال به متی سیلین کمتر از سایر پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین در دیواره باکتری می باشد. در باکتری حساس(فاقد ژن mec-A)، متی سیلین با میل ترکیبی بیشتری به پروتئین PBP در دیواره سلول متصل می شود که سبب لیز دیواره سلول باکتری و سرانجام مرگ آن می گردد. سویه های که دارای این ژن هستند به بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر هم مقاومت نشان می دهند(مقاومت چند داروئی) که علاوه بر ایجاد مشکلات در درمان بیماری، سبب کلونیزاسیون و انتشار در محیط بیمارستان، انتشار به سایر بیماران می گردند(۲).

به دلیل بیان غیر یکنواخت ژن mec-A، تست های تشخیصی و سنجش حساسیت ضد میکروبی معمولی در تشخیص دقیق باکتری و مقاومت به متی سیلین ناتوانند. لذا لازم است جهت تشخیص دقیق و کنترل بیماری از روشهای دقیق، سریع و اختصاصی تر همانند PCR استفاده شود که بر اساس تکثیر ژن mec-A عمل می کند(۸). این ژن در سویه MSSA وجود نداشته، و وجود آن در استافیلوکوک اورئوس نشانه مقاومت به متی سیلین (۹) است. بنابر این هدف این مطالعه شناسائی و تعیین فراوانی سویه های مقاوم و حساس به متی سیلین در ایزوله های بالینی جدا شده از بیمارستانهای همدان بود.

روش کار:

این پژوهش از نوع توصیفی در سال ۱۳۸۴ برروی ۷۰ ایزوله استافیلوکوک اورئوس که از مراکز درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان و یک آزمایشگاه خصوصی بدست آمده بودند، انجام گرفت. ایزوله های که تستهای گرم، کاتالاز، مانیتول، کواگولاز و DNase آنها مثبت بودند بعنوان استافیلوکوک اورئوس در نظر گرفته شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی نیز برروی محیط مولر هینتون آگار فاقد نمک انجام شد. بدینصورت که از باکتری رشد کرده بر روی محیط بلاد آگار(به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷° C) جهت تهیه سوسپانسیون برابر با ۰/۵ مک فارلند استفاده و بوسیله سواب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس آنتی بیوگرام هرسویه برای۱۲عدد دیسک آنتی بیوتیک(پادتن طب) شامل دیسک های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، تتراسایکلین(۳۰ میکروگرم)،اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱۲/۵ میکروگرم)، ریفامپین(۳۰ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین(۱۰ واحد)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) ،

[Downloaded from sjh.umsha.ac.ir on 2023-12-03]

سفالوتین (۳۰ میکروگرم) و کلوگزاسیلین (۵ میکروگرم) انجام شدند. سپس همه پلیت ها در دمای ۳۵° C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه، و نتایج بر اساس جدول شرکت سازنده آنتی بیوتیک تفسیر گردیدند(۲).

استخراج DNA: برای این منظور از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده گردید.

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن mec-A : از این تکنیک بعنوان روش استاندارد طلائی در ردیابی ژن mec-A در DNA استخراج شده از نمونه ها استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن mec-A شامل یک جفت پرایمر اختصاصی هر کدام (۲۲ bp) به صورت زیر بود که از شرکت سیناژن تهیه شد.

Forward primer
(1282) 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'
Reverse primer
(1787) 5'-AGT TCT GGA GTA CCG GAT TTG C -3'

طول قطعه حاصل از فعالیت این پرایمر ها ۵۳۳bp بود.

واکنش PCR شامل 2µL 10x buffer، 10mMdNTP 2.4µL، 2µL MgCl2 50mM، پرایمرها از هر کدام 1µL 10mM، Taq polymerase 2µL(0.5unit)، DNA Template 1µL، آب مقطر دیونیزه 8.6µL، حجم نهایی مجموعاً 20µL شد.

سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR شامل ۳۵ سیکل، ۶۰ ثانیه در ۹۵°C (denaturation)، ۳۰ثانیه در ۵۰°C جهت اتصال پرایمر (annealing)، ۹۰ثانیه در ۷۲°C برای تکثیر قطعه هدف (extension) بود. پس ازانجام آزمایش PCR ، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز، و در دستگاه ترانس لومیناتور تحت نور UV بررسی گردید(۱۰).

نتایج :

در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۷۰ نمونه جدا شده به روش دیسک آگار دیفیوژن (Disk Diffusion Agar = DDA) فقط ۲۲ مورد (۳۱/۴٪) مقاومت به دیسک متی سیلین/ اگزاسیلین را نشان دادند. در صورتی که در آزمایش PCR علاوه بر این ۲۲ مورد، ۱۳ مورد که در روش DDA حساسیت به اگزاسیلین را نشان می دادند دارای ژن mec-A بودند(جدول۱). بنابراین ایزوله هائی که در PCR دارای ژن mec-A بودن بعنوان سویه MRSA و آنهائی که فاقد ژن مذکور بودند سویه MSSA شناخته شدند.

جدول ۱: نتایج آنتی بیوگرام ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مطالعه شده(۷۰ مورد) با روش دیسک آگار دیفیوژن

	دیسک											
	P	RA	CX	CZ	CF	V	STX	GM	TE	E	CP	OXA
مقاوم	۷۰	۴	۳۲	۱۴	۱۲	-	۲۸	۱۰	۳۲	۲۸	۱۴	۲۲
حساس	-	۶۵	۳۵	۵۱	۵۲	۶۸	۴۲	۵۴	۳۸	۴۰	۵۶	۴۸
نیمه حساس	-	۱	۳	۵	۶	۲	-	۶	-	۲	-	-

اریترومایسین=E سیپروفلوکساسین=CP اگزاسیلین =OXA
کوتریموکسازول = STX جنتامایسین = GM تتراسایکلین = TE
سفتازیدیم = CZ سفالوتین = CF وانکومایسین = V
پنی سیلین = P ریفامپین = RA کلوگزایسلین = CX

بیشترین حساسیت ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مطالعه شده به شرح زیر بود:

۱- وانکومایسین ۶۸ مورد(۹۷/۱٪) ۲- ریفامپین ۶۵ مورد(۹۲/۸٪) ۳- سیپروفلوکساسین۵۶ مورد((۸۰٪) ۴- جنتامایسین ۵۴ مورد(۷۷/۱٪) ۵- سفالوتین ۵۲ مورد(۷۴/۲٪) ۶- سفتازیدیم ۵۱ مورد(۷۲/۸٪)

تمام سویه ها اعم از MRSA و MSSA مقاومت کامل را به دیسک پنی سیلین ۱۰ واحدی نشان دادند(جدول ۳و۲).

جدول۲: نتایج حاصل ازآنتی بیوگرام سویه های MRSA

	دیسک										
	CX	CZ	CF	P	RA	SXT	TE	E	GM	CP	OXA
مقاوم	۳۲	۱۸	۱۶	۳۵	۴	۲۴	۲۶	۲۴	۱۵	۱۴	۲۲
درصد	۹۱/۴	۵۱/۴	۵۴/۷	۱۰۰	۱۱/۴	۶۸/۵	۷۴/۲	۶۸/۵	۴۲/۸	۴۰	۳۱/۴

بیشترین مقاومت سویه های MRSA به آنتی بیوتیک های زیر بود :

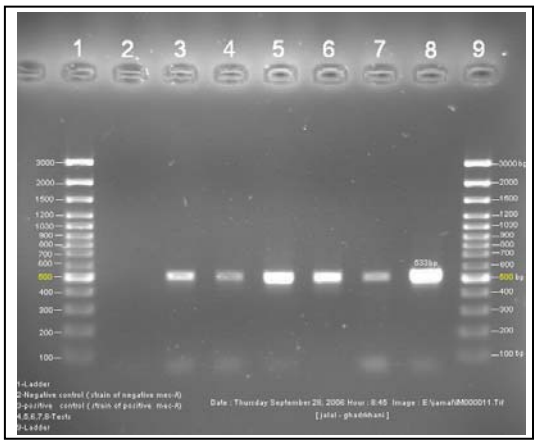
۱- پنی سیلین ۳۵ مورد(۱۰۰٪) ۲- کلوگزاسیلین ۳۲ مورد (۸۸/۶٪) ۳- تتراسایکلین ۲۶ مورد(۷۴/۲٪) ۴- اریترومایسین ۲۴ مورد(۶۸/۵٪) ۵- کوتریموکسازول ۲۴ مورد(۶۸/۵٪) ۶- سفتازیدیم ۱۸ مورد(۵۱/۴٪) و کمترین مقاومت به ریفامپین ۱۱/۴٪ بود

جدول۳ : نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های MSSA

	دیسک										
	CX	CZ	CF	P	V	RA	SXT	TE	E	GM	CP	OXA
حساس	۳۵	۳۴	۳۴	.	۳۵	۳۵	۳۱	۲۹	۲۹	۳۴	۳۵	۳۵
درصد	۱۰۰	۹۷/۱	۹۷/۱	۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۸/۵	۸۲/۵	۸۲/۸	۹۷/۱	۱۰۰	۱۰۰

طبق نتایج مطالعه تمام سویه های حساس به متی سیلین (MSSA) حساسیت خیلی بالایی نسبت به پانل آنتی بیوتیکی نشان می دادند.

[Downloaded from sjh.umsha.ac.ir on 2023-12-03]



تصویر۱: الکتروفورز انجام شده بر روی محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ :

- چاهکهای ۱ و ۹ مارکر وزن ملکولی(100-3000bp)
- چاهک ۲ سوش کنترل منفی، فاقد ژن *mec-A* [MSSA ATCC 25923]
- چاهک ۳ سوش کنترل مثبت، دارای ژن *mec-A* [MRSA ATCC 43300]
- چاهکهای ۴،۵،۶،۷ و ۸ نمونه های مثبت دارای ژن *mec-A* 533 bp

بحث:

یافته های این مطالعه نشان دادند که استفاده از روشهای دقیق و حساس همانند PCR در شناسایی سویه MRSA در آزمایشگاه بعنوان روش روتین می تواند در تشخیص صحیح آنها از MSSA کمک شایانی کرده و در اتخاذ آنتی بیوتیکهای موثر مفید باشد. در غیر اینصورت استفاده از آنتی بیوتیکهای غیر ضروری در درمان سویه حساس MSSA باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی خواهد شد. لذا کاهش حساسیت این سویه ها به آنتی بیوتیک های همانند سیپروفلوکساسین،تترا سایکلین، جنتامایسین، اریترو مایسین، سفالوتین و سفتازیدیم شاید به این دلیل باشد که در همدان از این آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های ناشی از این سویه ها و سایر عفونت های ایجاد شده توسط باکتریهای دیگر زیاد استفاده می شود(۱۱). بعلاوه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی حاکی از آن است که سویه هایMRSA نسبت به سویه های MSSA مقاومت چند داروئی را نشان می دهند.

نظر به اینکه سویه های MRSA تنها به آنتی بیوتیک وانکومایسین حساسیت دارند مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان مبتلایان به عفونت ناشی از MRSA می تواند عواقب خطرناکی را به دنبال داشته باشد که شامل افزایش آنتروکوک های مقاوم به وانکومایسین و بالاتر از آن خطر ایجاد سویه های MRSA مقاوم به وانکو مایسین است که در چنین مواردی درمان بیمار واقعاً مشکل می گردد. آمارها نشان می دهند که سویه های MRSA مقاوم به وانکومایسین درحال افزایش هستند(۱۲).

مطالعات مشابه در شیراز نیز نشان داده است که میزان MRSA از ۳۳٪ در سال ۲۰۰۰ به ۴۳٪ در سال ۲۰۰۴ رسیده است(۱۳،۱۴).

همانطور که در مطالعات مشابه ای که در بالا و مقدمه اشاره شد. شاهد افزایش سال به سال این سویه ها هستیم که علاوه بر اینکه یک چالش جدی برای پزشکان و مدیریت کنترل کننده عفونت ها بیمارستانی می باشند در کشور های که شاخص های بهداشتی و مراقبتی پایین دارند انتظار داریم با درصد افزایش یابنده ای از سویه های MRSA در سطح جامعه و به خصوص بیمارستان مواجه شویم. از طرفی شیوع واقعی سویه های MRSA وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی دارد بنابراین عاقلانه است که به دلیل تغییر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی دراستافیلوکوک اورئوس بررسی های دوره ای این تغییرات هر ۳ تا ۴ سال یکبار انجام گیرد(۱۴،۱۵).

نتیجه نهایی :

نتایج این پژوهش نشان داد که بروز MRSA در مراکز درمانی همدان به سطح ۵۰ درصد رسیده است و ما باور داریم که در حال حاضر یک فرصت مداخله موثر در محدود کردن شیوع MRSA در سطح مراکز بهداشتی و جامعه وجود دارد اما به طور قطع این فرصت در آینده وجود نخواهد داشت.

منابع :

1. Shehab el-din SA, El-shfey EII, El-hadiy MR, El- dlin AB, El-hadiy MM, Zaghlvul HA. Methicillin resistant staphylococcus aureus, a problem in the burns unit. Egypt. J. Plast. Reconstr Surg 2003; 27(1):1-10
2. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. Detection and expression of Methicillin/oxacillin resistance in Multidrug-resistant and non-Multidrug-resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother 2002;49(5):793-801.
3. Sakoulas G, Cold HS, Vencataraman L, Degirolami PC, Eliopouls GM, Qian Q. Methicillin- resistant staphylococcus aureus comparison of susceptibility testing methods and analysis of mec-A positive susceptible strains: J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3946-3951.
4. Jenison R, Heaberil A, Yang S, Polisky B, Ostrosf R. Thin film bio senser for rapid

[Downloaded from sjh.umsha.ac.ir on 2023-12-03]

detection of mec-A from methicillin- resistant staphylococcus aureus. Clin Chem 2000; 46(9):1501-1504

5. Arbique J, Forward K, Haldane D, Davidson S Comparison of the Velogene Rapid MRSA Identification Assay, Denka MRSA-Screen Assay, and BBL Crystal MRSA ID System for rapid identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Diag Microbial Infect Dis 2001; 40(1-2):5-10.
6. Leibovici L, Soares-Weiser K, Paul M, Goldberg E, Herxheimer A, Garner P. Considering resistsnce in systemic reviews of antibiotic treatment. J Antimicrob Chemother 2003; 52(4): 564-571
7. Ho Pl, Tse CWS, Mak GC, Chow KH, Ng TK. Community-acquired methicillin- resistant staphylococcus in Hon Kong. J Antimicrob Chemother 2004; 54(4): 845-846.
8. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, etal. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). PNAS 2002;99(11): 7687-7692
9. Hallin M, Maes N, Byl B, Jacobs F, De Gheldre Y, Struelens MJ. Clinical Impact of a PCR Assay for Identification of Staphylococcus aureus and Determination of Methicillin Resistance Directly from Blood Cultures. J Clin Microbiol 2003;41(8):3942-3944
10. Zamani AR, Tavakkol Afshari J, Alikhani MY. Molecular cloning and expression of human gamma interferon full cDNA in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Iranian J Immunol 2006,3(1): 1-7
11. Harbarth S, Martin Y, Rohner P, Henry N, Auckenthaler R, Pittet D. Effect of delayed infection control measures on a hospital outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Hosp Infect 2000; 46(1): 43-49.
12. Naimi TS, Anderson D, Carol B, Boxrud DJ, Johnson SK, Tenover FC, et al. Vancomycin- intermediate staphylococcus aurues with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with reccurent bactremia. Clin Infect Dis 2003;36(12):1609-1612
13. Alborzi A, Pourabbas BA, Salehi H, Pourabbas BH, Obiidi B, Panjehshahin MR. Prevalence and pattern of antibiotic sensitivity of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Shiraz. Iranian. J Med Sci 2000;25(1,2): 1-8.
14. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modification DNA extraction for rapid PCR detection of Methicillin-resistant Staphylococci. Iranian Biomed J 2004;8(3): 161-165
15. Muller AA, Maumy F, Bertin M, Gorntte C, Lopez-Lopezlozano JM, Viel JF, et al. Relationship between spread of methicillin-resistant staphylococcus aureus and antimicrobial use in a French university hospital. Clin Infect Dis 2003; 36(8): 971-978.

[Downloaded from sjh.umsha.ac.ir on 2023-12-03]