

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس در نمونه‌های بیمارستانی

چکیده

مرضیه علی قلی^۱

محمد ایمان عینی^{۱*}

فرهاد بنکدار هاشمی^۱

شادی شاهسون^۱

فرشته جبل عاملی^۱

بهرام کاظمی^۲

۱. گروه میکروبی شناسی

۲. مرکز بیولوژی مولکولی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس آرتوس (SA) یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی می‌باشد. ظهور سویه‌های استاف آرتوس مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌ویژه سویه‌های SA مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) مشکلات فراوانی در درمان عفونت‌های حاصل از ارگانیسم‌های SA ایجاد کرده است، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دانستن الگوی منطقه‌ای مقاومت برای درمان مناسب عفونت‌های MRSA و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم بسیار ضروری است.

روش بررسی: در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۳۳۸ سویه SA جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف با روش DAD، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) و PCR بررسی شده است.

یافته‌ها: در روش DAD، (۱۶۰/۳۳۸) ۴۷٪ از سویه‌های SA نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و کمترین مقاومت نسبت به ونکومايسين (۲۰/۳۳۸) ۶٪ بود. در روش PCR (۱۶۲/۳۳۸) ۴۸٪ از سویه‌ها حاوی ژن *mecA* بودند. MIC اگزاسیلین در ۹۳٪ از سویه‌ها بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سویه‌های MRSA مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۴۰/۵٪)، اریترومايسين (۴۰٪) و سیپروفلوکساسین (۳۸٪) داشتند ولی سویه‌های MSSA مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های ونکومايسين (۵٪) و اریترومايسين (۳/۵٪) داشتند.

نتیجه‌گیری: انتخاب آنتی بیوتیک مناسب به منظور درمان صحیح عفونت‌های SA و جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های موثر برعلیه سویه‌های SA حائز اهمیت فراوان است. همچنین تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیازمند مطالعه گسترده‌تر با نمونه‌های بیشتر و مراکز درمانی مختلف می‌باشد.

کلمات کلیدی: MRSA، DAD، PCR.

*نشانی: گروه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۸۹۵۵۸۱۰

پست الکترونیک:

emaneini@razi.tums.ac.ir

مقدمه

در جنس استافیلوکوکوس، گونه استافیلوکوکوس آرتوس (SA) در همه جا از قبیل دستگاه تنفسی و بر روی پوست بسیاری از بزرگسالان حضور دارد، و به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در عفونت‌های بیمارستانی و خارج بیمارستانی مطرح می‌باشد.^{۱،۲} ظهور سویه‌های مقاوم مشکلات فراوانی در درمان عفونت‌های حاصل از ارگانیزم SA ایجاد کرده‌است. در طی دوده گذشته میزان سویه‌های SA مقاوم به متی‌سیلین *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) در مناطق مختلف جهان افزایش یافته است.^۳

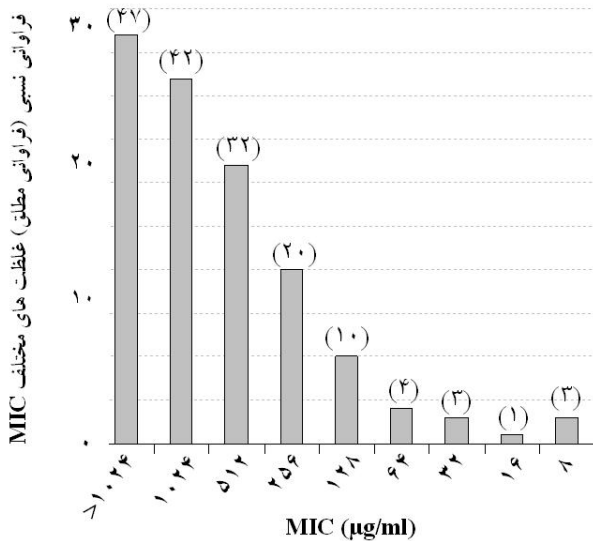
به علت بالا بودن میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی سویه‌های MRSA، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و آگاهی از الگوی منطقه‌ای مقاومت به منظور راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله سویه‌های MRSA بسیار ضروری است.^۱ در ایران اطلاعات دقیقی در زمینه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های MRSA وجود ندارد.

هدف این مطالعه تعیین الگوی منطقه‌ای مقاومت سویه‌های مختلف SA [سویه‌های حاوی ژن *mecA* و سویه‌های فاقد آن *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus* (MSSA)] به منظور راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت‌های MRSA و کنترل عفونت، می‌باشد.

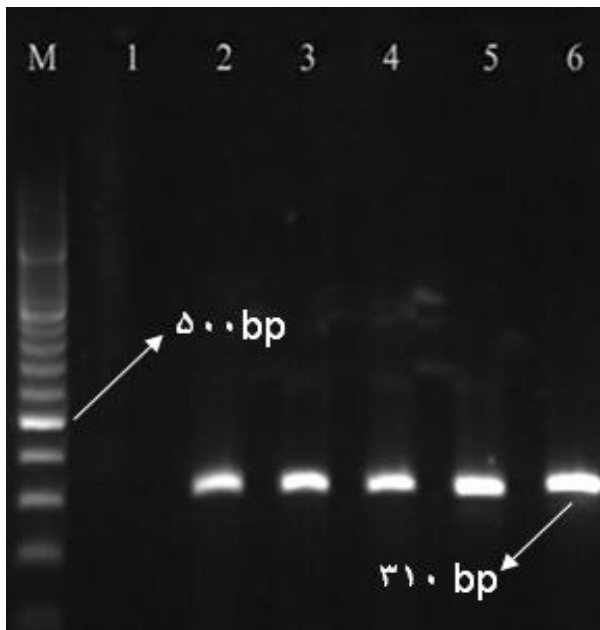
روش بررسی

در این مطالعه تعداد ۳۳۸ گونه استافیلوکوکوس آرتوس از نمونه‌های بالینی متفاوت (مثل خون، زخم، ادرار) بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی (ره) جمع‌آوری شده است. گونه‌های استافیلوکوکوس آرتوس بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، واکنش کوآگولاز، حساسیت به دیسک باستیراسین ۰/۰۴ واحد، تست دزوکسی ریبونوکلاز، مقاومت

به پلی‌میکسین و تولید اوره‌آز شناسایی شدند. میزان حساسیت سویه‌های SA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر اساس راهنمای National Committee for Clinical Lab Standards تعیین شد.^۴ حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سپیروفلوکسازین (دیسک ۵ μg)، اریترومایسین (دیسک ۱۵ μg)، جنتامایسین (دیسک ۱۰ μg)، آگراسیلین (متی‌سیلین) (دیسک ۱ μg)، ریفامپین (دیسک ۵ μg) و ونکومایسین (دیسک ۳۰ μg) (BBL™ Sensi Disc, Sparks, Maryland, USA) با روش Disk Agar Diffusion (DAD) بر روی محیط مولر هیتون‌آگار و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی یا MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنتی بیوتیک آگراسیلین به روش Micro Dilution انجام شد. سویه‌های استاندارد از *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 و *Enterococcus faecalis* ATCC29212 به عنوان کنترل واکنش استفاده شدند. در روش DAD نتایج به صورت حساس (S)، حساس نسبی (I) و مقاوم (R) ثبت شدند. برای استخراج DNA سویه‌های SA از روش جوشاندن استفاده شد، سه تا پنج کلنی از کشت ۲۴ ساعته سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس در محیط مولر هیتون آگار برداشته و با ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل‌کرده به مدت ۱۵ دقیقه در آب‌جوش قرار داده و در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شده و از مایع رویی جهت انجام واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن *mecA* از پرایمرهای *mecA* F 5'- CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG- 3' و *mecA* R 5'- TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG- 3' استفاده شد که محصول آن قطعه‌ای به طول ۳۱۰ bp بود. واکنش PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۰/۵ μM Primers، ۲/۵ mM MgCl₂، ۱ X PCR Buffer، ۲ mM dNTP Mix و Taq DNA Polymerase 2.5U بود. واکنش‌های PCR در ترموسایکلر (مدل اپندورف ۵۳۳۰) و با شرایط [۵ دقیقه در دمای ۹۴ °C، ۳۰ لوپ (۹۴ °C به مدت ۳۰



نمودار ۱- میزان MIC سویه های استافیلوکوکوس آرتوس حاوی ژن *mecA* به آنتی بیوتیک آگزیسلین



شکل ۱- آنالیز الکتروفورزی محصولات PCR ژن *mecA* در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس. M: مارکر، ستون ۱: کنترل منفی واکنش، ستون ۲: کنترل مثبت واکنش، ستون ۳ تا ۶: سویه های استافیلوکوکوس جدا شده از نمونه های بالینی

ثانیه، 58°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۴۵ ثانیه) و پنج دقیقه در دمای 72°C انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل الکتروفورز با آگاروز ۱/۵٪ آنالیز شدند.

یافته ها

میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس آرتوس به آنتی بیوتیک های مختلف در روش DAD در جدول شماره ۱ ارائه شده است. بیشترین مقاومت مربوط به آگزیسلین بود، تقریباً نیمی از سویه ها به آن مقاوم بودند. همچنین سویه های استافیلوکوکوس آرتوس مقاومت کمی به ریفامپین و ونکومايسين داشتند، و حساسیت آنها نسبت به جنتامایسین، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین نیز به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافته بود.

در روش DAD (۴۷٪) ۱۶۰ سویه استافیلوکوکوس آرتوس به آگزیسلین (متی سیلین) مقاوم بودند، اما در روش PCR و MIC (۴۸٪) ۱۶۲ سویه حاوی ژن *mecA* (شکل شماره ۱) بودند، که MIC (۹۳٪) ۱۵۱ سویه، بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود (نمودار شماره ۱).

نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت بالای سویه های MRSA به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین بود (جدول شماره ۲) اما بیشتر این سویه ها به ونکومايسين و ریفامپین حساس بودند.

بیشترین مقاومت سویه های MSSA مربوط به آنتی بیوتیک های ونکومايسين و اریترومايسين بود (جدول شماره ۳)، همچنین این سویه ها مقاومت کمی نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین داشتند.

سویه های MRSA نسبت به سویه های MSSA مقاومت بسیار بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، اریترومايسين و سیپروفلوکساسین داشتند (جدول شماره ۴). ولی مقاومت سویه های MSSA نسبت به آنتی بیوتیک ونکومايسين بالاتر از سویه های MRSA بود.

جدول ۱- فراوانی مطلق (فراوانی نسبی)* مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های استافیلوکوکوس آرنوس

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جتتامایسین	اگزاسیلین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۱۳۶ (۴۰)	۱۴۹ (۴۴)	۱۴۵ (۴۳)	۱۶۰ (۴۷)	۱۰ (۳)	۲۰ (۶)
حساس نسبی (I)	۴ (۱)	۵ (۱)	۲ (۱)	۴ (۱)	۲ (۱)	۰ (۰)
حساس (S)	۱۹۸ (۵۹)	۱۸۴ (۵۵)	۱۹۱ (۵۷)	۱۷۴ (۵۲)	۳۲۶ (۹۶)	۳۱۸ (۹۴)
جمع	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)	۳۳۸ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند.

جدول ۲- فراوانی مطلق (فراوانی نسبی)* مقاومت سویه‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش DAD

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جتتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۱۳۰ (۸۰)	۱۳۶ (۸۴)	۱۳۷ (۸۵)	۸ (۵)	۲ (۱)
حساس نسبی (I)	۴ (۲/۵)	۱ (۱)	۰ (۰)	۲ (۱)	۰ (۰)
حساس (S)	۲۸ (۱۷/۵)	۲۵ (۱۵)	۲۵ (۱۵)	۱۵۲ (۹۴)	۱۶۰ (۹۹)
جمع	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)	۱۶۲ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند.

جدول ۳- فراوانی مطلق (فراوانی نسبی)* مقاومت سویه‌های MSSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش DAD

واکنش	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جتتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
مقاوم (R)	۵ (۳)	۱۲ (۷)	۷ (۴)	۱ (۱)	۱۸ (۱۱)
حساس نسبی (I)	۰ (۰)	۴ (۲)	۲ (۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
حساس (S)	۱۷۱ (۹۷)	۱۶۰ (۹۱)	۱۶۷ (۹۵)	۱۷۵ (۹۹)	۱۵۷ (۸۹)
جمع	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)	۱۷۶ (۱۰۰)

*درصدها گرد شده‌اند.

جدول ۴- فراوانی مطلق (فراوانی نسبی)* مقاومت سویه‌های MRSA و MSSA به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

سویه	سیپروفلوکساسین	اریترومایسین	جتتامایسین	ریفامپین	ونکومایسین
MSSA	۵ (۱)	۱۲ (۳/۵)	۷ (۲)	۱ (۰/۵)	۱۸ (۵)
MRSA	۱۳۰ (۳۸)	۱۳۶ (۴۰)	۱۳۷ (۴۰/۵)	۸ (۲)	۱ (۰/۵)

*درصدها گرد شده‌اند، کل نمونه‌ها ۳۳۸ بوده است.

بحث

بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس مشکلات فراوانی در درمان بیماری های ناشی از این ارگانیسم ها در نقاط مختلف جهان از جمله ایران ایجاد کرده است. جهت درمان مناسب و کنترل عفونت های بیمارستانی نیاز به دانستن الگوی مقاومت استافیلوکوکوس آرتوس می باشد. متاسفانه اطلاعات مناسبی در مورد میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس آرتوس به آنتی بیوتیک های مختلف در ایران وجود ندارد. هدف این مطالعه بررسی میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس آرتوس به آنتی بیوتیک های رایج در بیمارستان امام خمینی به منظور ارائه راهنمایی جهت درمان مناسب بیماری های استافیلوکوکی و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم در جامعه می باشد. نتایج این مطالعه حاکی از وجود ژن *mecA* در ۴۸٪ از سویه های استافیلوکوکوس آرتوس بود، که این میزان مقاومت مشابه درصد شیوع این سویه ها در بیمارستان های بزرگ جنوب شرق آسیا،^۵ و بیشتر از کشورهای شمال اروپا و خاورمیانه (به جز بیمارستان های بزرگ عربستان سعودی) می باشد.^{۷-۱۳} همچنین این میزان مقاومت کمتر از گزارش ممیشی و همکاران^{۱۴} است. این اختلاف احتمالاً به دلیل محدود بودن مطالعه ممیشی به عفونت های خونی در کودکان و استفاده از روش DAD به تنهایی و تنوع نمونه های مورد بررسی در این مطالعه است. مقاومت پایین به ریفامپین و ونکومایسین نیز مشاهده شده در این مطالعه مشابه گزارشات موجود از مناطق مختلف جهان می باشد و بیانگر انتخاب این آنتی بیوتیک ها به عنوان گزینه ای برای درمان عفونت های

استافیلوکوکی مطرح می باشد. در این مطالعه نیز مشخص شد که همانند سایر مناطق جهان سویه های استافیلوکوکوس آرتوس مقاومت بسیار بالایی به داروهای آمینوگلیکوزیدی و سیپروفلوکساسین یافته اند. اختلاف مشاهده شده بین نتایج DAD و PCR احتمالاً ناشی از وجود سویه های با حساسیت نسبی نسبت به آگراسیلین می باشد که در روش DAD به صورت حساس نسبی گزارش می شوند ولی حاوی ژن *mecA* هستند. روش استاندارد برای شناسایی سویه های استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متی سیلین روش PCR می باشد. در این مطالعه MIC در ۹۳٪ از سویه های MRSA، بیش از ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود که بسیار بالاتر از گزارش های موجود در منطقه خاورمیانه می باشد،^{۱۱-۱۳} و احتمالاً به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایران است. نکته قابل توجه مقاومت بالای سویه های MRSA در مقایسه با سویه های MSSA نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی و سیپروفلوکساسین می باشد، که با ظهور مقاومت به آگراسیلین در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس، میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز به شدت بالا رفته است، این امر احتمالاً می تواند بیانگر ارتباطی بین ظهور مقاومت به آگراسیلین (متی سیلین) و مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها باشد. نتایج این مطالعه می تواند مورد توجه پزشکان جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب به منظور جلوگیری از بروز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های موثر بر علیه استافیلوکوکوس آرتوس قرار گیرد. همچنین تعیین دقیق الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نیازمند مطالعه گسترده تر با نمونه های بیشتر و مراکز درمانی مختلف می باشد.

References

1. Chambers H. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10: 781-91.
2. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 505-20.
3. Cunha BA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 33-42.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M7-A5. 5th ed. Villanova PA. USA. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2004.
5. Westh H, Zinn CS, Rosdahl VT. An International multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microb Drug Resistance* 2004; 10: 169-76.
6. Zinn CS, Westh H, Rosdahl VT. An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microbial Drug Resistance* 2004; 10:160-8.
7. Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatzi F, Kontos F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospitals of Central Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 18: 61-5.
8. Oztop AY, Pinarbasi H, Kocagoz S, Bakici MZ, Bakir M. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a teaching hospital in turkey. *Microb Drug Resist* 2004; 10:154-59.
9. Araj GF, Uwaydah MM, Alami SY. Antimicrobial susceptibility patterns of bacterial isolates at the American University Medical Center in Lebanon. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 20:151-8.
10. Jumaa PA, Neringer R. A survey of antimicrobial resistance in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates. *J Chemother* 2005; 17: 376-9.
11. Kanj SS, Ghaleb PA, Araj GF. Glycopeptide and oxacillin activity against *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care center in Lebanon. *J Med Liban* 2004 52: 8-12.
12. Austin TW, Austin MA, McAlear DE, Coleman BT, Osoba AO, Thaqafi AO, et al. MRSA prevalence in a teaching hospital in Western Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2003; 24: 1313-6.
13. Durmaz B, Durmaz R, Sahin K. Methicillin-resistance among Turkish isolates of *Staphylococcus aureus* strains from nosocomial and community infections and their resistance patterns using various antimicrobial agents. *J Hosp Infect* 1997: 325-9.
14. Mamishi S, Pourakbari B, Ashtiani C, Hashemi FB. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bloodstream infections at Children's Medical Center, Tehran, Iran 1996-2000. *Int J Antimicrob* 2005; 26: 373-79.

Determination of antimicrobial resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens

Abstract

M. Aligholi¹
M. Emameini^{1*}
F. B. hashemi¹
Sh. Shasavan¹
F. Jebelameli¹
B. kazemi²

1. Department of
Microbiology, School of
Medicine, Tehran University
of Medical Sciences
2. Center for Molecular
Biology Research, School of
Medicine, Shahid Beheshti
University of Medical
Sciences

Background: *Staphylococcus aureus* (SA) is an important cause of nosocomial and community-acquired infections. The emergence of antibiotic resistance, especially in methicillin-resistant SA (MRSA) strains, has caused difficulties in treatment of such infections. The determination of antibiotic resistance patterns, particularly domestic patterns of Iran, is essential for appropriate treatment of MRSA infections and proper infection control measures in our country.

Methods: The antibiotic resistance of 338 SA isolates from various clinical specimens was determined by disk agar diffusion (DAD), minimum inhibitory concentration (MIC) and polymerase chain reaction (PCR) methods.

Results: Using the DAD method, 47% (160/338) of the SA isolates were resistant to oxacillin, and only 6% (20/338) were resistant to vancomycin. By PCR, 48% (162/338) of the isolates had the *mecA* gene. The MIC of oxacillin in 93% of isolates was higher than 256µg/mL. The MRSA isolates, showed a high resistant to gentamicin (40.5%), erythromycin (40%), and ciprofloxacin (38%). However, only a few of the SA isolates showed a high resistance to vancomycin (5%) or erythromycin (3.5%).

Conclusion: The results of this study can provide guidance for physicians toward a more appropriate treatment of SA infections in Iran, thereby preventing the emergence of further antibiotic resistance among SA. Our results also revealed the need for further investigations using a higher number of specimens representing a wider variety of locations to determine the antibiotic resistance patterns in our state more precisely.

Keywords: MRSA, DAD, PCR.

* Department of Microbiology,
School of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences,
Tel: +98-21-88955810
Email: emameini@yahoo.com