تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیماران در اصفهان

فاتح رحیمی[۱*]، شرمین کریمی[۲]، محمد رضا پورشفیع[۳]

۱. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲. دانشجوی دکترای تخصصی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۳. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استاد بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، f.rahimi@sci.ui.ac.ir
دریافت مقاله: مرداد نود و دو پذیرش برای چاپ: مهر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری زای انسانی و دامی است که به عنوان بیماری زای بیمارستانی و هم چنین اکتسابی از جامعه شناخته می شود که واجد طیف وسیعی از باکتری خوارها و همچنین عوامل حدت است. مقاومت به متی‌سیلین در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از حضور ژن mecA است. ژن mecA، ژن‌های تنظیم کننده و ژن های رمز کننده مقاومت به چند عامل ضد باکتریایی و لوکوس ژنی ccr بر روی کاست ژنی SCCmec قرار گرفته اند. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، تایپینگ و ناهم گونی کلاستر ژن mec در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا سازی شده از بیماران در طی سال های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در شهر اصفهان به انجام رسیده است.*

روش کار: *در این مطالعه در مجموع ۲۹۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا سازی شده از یک بیمارستان در شهر اصفهان مورد مطالعه قرار گرفت. تمامی جدایه ها با استفاده از پرایمر اختصاصی تا حد گونه شناسایی شدند. حساسیت جدایه ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و هم چنین حداقل غلظت مهار کننده آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک های اگزاسیلین و ونکومایسین به روش broth micro dilution با استفاده از توصیه های Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI) تعیین گردید. جهت تعیین وجود پروفاژهای مختلف در جدایه های مقاوم به متی سلین آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۶ دسته پروفاژی استفاده شد. حضور ژن mecA در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از آزمون PCR و تایپ کاست ژنی mecA و لوکوس ژنی ccr در این جدایه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش multiplex-PCR بررسی شد.*

نتایج: *در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۰۱ سویه (۳۴/۵٪) به عنوان سویه های مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. بیش ترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های اریترومایسین (۸۸ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۵ درصد)، کلیندامایسین (۸۴) و توبرامایسین (۸۱ درصد) مشاهده گردید. هیچ کدام از سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های ونکومایسین، لینزولید و سینرسید مقاومت نشان ندادند. هم چنین ۷۰ درصد سویه ها از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. ۲ پروفاژ تایپ و ۲ ساب تایپ مختلف در میان سویه ها شناسایی گردید. تمامی سویه ها واجد ژن mecA و SCCmec تایپ III و تایپ ۳ ccr بودند.*

نتیجه گیری: *وجود پروفاژهایی از دسته های مختلف که کد کننده طیف وسیعی از عوامل حدت هستند و هم چنین مقاومت بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین می تواند نشان دهنده اهمیت نقش باکتریوفاژها در گسترش و تکامل عوامل حدت در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس باشد. پراکندگی بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد SCCmec تایپ III که شاخص سویه های بیمارستانی است نشان دهنده شیوع بالای جدایه های بسیار بیماری زای واجد مقاومت چندگانه نسبت به بسیاری از داروهای معمول خطوط اول و دوم درمانی است که می تواند یک تهدید بالقوه برای سلامت عمومی و بهداشت جامعه باشد.*

واژگان کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، پروفاژ، mecA، SCCmec، ccr***

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس متشکل از باکتری های گرم مثبتی است که پوست و غشاءهای مخاطی انسان و حیوانات را کلنیزه می کنند. به رغم اینکه استافیلوکوکوس ها بخشی از فلور طبیعی انسان هستند و میکروارگانیسم های کامنسال محسوب می شوند، اما به عنوان باکتری های بیماری زای فرصت طلب نیز شناخته می شوند که عامل ایجاد طیف گسترده ای از بیماری ها در انسان و سایر حیوانات هستند(۱, ۲). در میان استافیلوکوکوس ها، استافیلوکوکوس اورئوس مهاجم ترین گونه است و به عنوان یکی از عوامل پیش رو در ایجاد عفونت های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده و مسئول ایجاد طیف گسترده ای از بیماری ها، از یک عفونت کوچک پوستی تا پنومونی نکروزه کننده کشنده، می باشد(۳).

از زمان معرفی پنی سیلین برای اهداف بالینی در اوایل ۱۹۴۰، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام رو به افزایش نهاده است. این پدیده نتیجه کسب پلاسمید رمز کننده پنی سیلیناز (آنزیم هیدرولیز کننده پنی سیلین) است که قادر به شکستن حلقه بتا-لاکتام و متعاقبا غیرفعال کردن مولکول آنتی بیوتیک می باشد. جدایه های مقاوم به پنی سیلین به سرعت نه تنها در بیمارستان ها و مراکز بهداشتی بلکه در اجتماع نیز پراکنده شدند(۴). برای غلبه بر عفونت های ناشی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین، یک پنی سیلین نیمه صناعی با طیف محدود (متی سیلین) معرفی گردید. اما به سرعت در سال ۱۹۶۱، نخستین جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant Staphylococcus aureus) شناسایی گردید. در ابتدا مواجهه با جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تنها در بیمارستان ها بود، اما در اواخر دهه ۱۹۹۰ نخستین کلون های حاد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه (hospital acquired MRSA) که مشخصه بارز آنها وجود سم لوکوسیدین پنتون ولنتاین بود، شناسایی و با سرعت غیرقابل باوری گسترش پیدا کرد(۳). آنها به سرعت در سراسر جهان، ابتدا تنها در جوامع و بعدها در بیمارستان ها و مراکز درمانی، گسترش یافتند و حتی جای گزین جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان (community acquired MRSA) شدند. به همین دلیل، امروزه افتراق میان جدایه های CA-MRSA و بیش تر جدایه های HA-MRSA واجد مقاومت چند آتی بیوتیکی به یک چالش بزرگ تبدیل شده است(۵, ۶).

مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین، ناشی از حضور ژن mecA است که رمز کننده یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین ۷۸ کیلو دالتونی (PBP2a یا 'PBP2) می باشد. در مقایسه با سایر PBPs، PBP2a از میل ترکیبی پایینی نسبت به تمامی آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام برخوردار می باشد. بنابراین، حتی در حضور آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام، بیوسنتز لایه پپتیدوگلایکان متوقف نشده و باکتری می تواند به حیات خود ادامه دهد(۶). ژن mecA در میان اپرون mec و هم راه با ژن های تنظیمی خود یعنی mecI و mecR1 قرار گرفته است(۳). ورزه mec توسط مجموعه کروموزومی mec استافیلوکوکی (SCCmec) حمل می شود. خاست گاه و منشاء ژن mec نامشخص است، اما پیش نهاد شده است که احتمالا از استافیلوکوکوس سیوری به استافیلوکوکوس اورئوس منتقل شده باشد؛ و استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی واجد ژن mecA مانند استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس مخازن بالقوه عناصر SCCmec به شمار می روند(۷, ۸). به عبارت دیگر، پیش نهاد شده است که منبع اصلی SCCmec می تواند خود جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین باشد.

این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، تایپینگ و ناهم گونی کلاستر ژن mec در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا سازی شده از بیماران در طی سال های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در شهر اصفهان به انجام رسیده است.

روش کار

جهت انجام این مطالعه در مجموع ۲۹۳ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس در طی ۹ ماه در حد فاصل سالهای ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از یک بیمارستان در شهر اصفهان جدا سازی گردید. در آزمایشگاه بیمارستان مذکور تمامی جدایه ها به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته بودند. در آزمایشگاه مجددا تمامی جدایه ها در ابتدا با استفاده از آزمون های استاندارد بیوشیمیایی رنگ آمیزی گرم، کواگولاز و DNase و تخمیر قند مانیتول مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند(۹).

پس از حصول اطمینان از شناسایی و تأیید ابتدایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، نسبت به غربال گری سویه ها از نظر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۱ میکروگرم) اقدام شد. برای این منظور از روش دیسک دیفیوژن بر اساس استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده شد(۱۰). پس از تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین، مقاومت این سویه ها نسبت به ۱۵ آنتی بیوتیک (آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کینوپریستین/دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، لینزولید (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)) و با استفاده از محیط Muller Hinton Agar (Merck, Darmstadt, Germany) واجد ۴٪ نمک بررسی شد. تمامی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده از شرکت BBL (Sparks, MD, USA) تهیه شدند. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک های اگزاسیلین و ونکومایسین سویه های مقاوم به متی سیلین از روش broth micro dilution و بر اساس دستورالعمل و استانداردهای CLSI استفاده شد(۱۱).

جهت استخراج DNA برای انجام آزمون های مولکولی از کیت QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Heidelberg, Germany) با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده و با اندکی تغییرات استفاده گردید.

پس از اینکه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند، جهت تأیید گونه از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی nuc که رمزکننده آنزیم ترمونوکلئاز است، استفاده شد. جهت انجام این آزمون از جفت پرایمر طراحی شده توسط Zouharova و هم کاران(۱۲) استفاده شد. اندازه قطعه مورد انتظار ۴۰۰ جفت باز بود. تکثیر ژن nuc با مخلوط و با استفاده از چرخه حرارتی طراحی شده توسط Zouharova و هم کاران انجام گرفت(۱۲).

جهت تشخیص وجود ژن mecA در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی که توسط McClure و هم کاران(۱۳) طراحی شده بود، استفاده گردید. قطعه مورد انتظار ۳۱۰ جفت باز بود. تکثیر ژن mecA با مخلوط واکنش و با استفاده از چرخه حرارتی طراحی شده توسط McClure و هم کاران انجام گرفت(۱۳).

جهت شناسایی وجود پروفاژ تایپ های مختلف و هم چنین انجام پروفاژ تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر یک از ۵ پروفاژ تایپ (SGA, SGB, SGF, SGD and AGL) و هم چنین ۲ ساب تایپ (SGFa and SGFb) که توسط Pantucek و هم کاران(۱۴) طراحی شده بود مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر ژن های فوق با مخلوط واکنش PCR و با استفاده از چرخه حرارتی طراحی شده توسط رحیمی و هم کاران انجام گرفت(۱۵, ۱۶).

جهت تعیین تایپ های مختلف SCCmec از آزمون Multiplex-PCR با ۸ جفت پرایمر استفاده شد. در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی که توسط Zhang و هم کاران(۱۷) طراحی شده بودند، جهت تعیین تایپ SCCmec در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی - سیلین استفاده گردید. تکثیر ژن های فوق با مخلوط واکنش Multiplex-PCR و با استفاده از چرخه حرارتی طراحی شده Zhang و هم کاران و با چند تغییر، انجام گرفت.

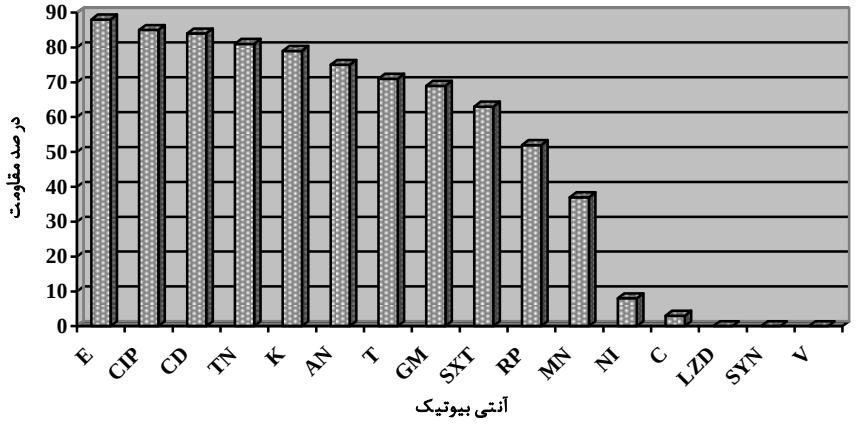
به واسطه اهمیت این جایگاه ژنی ccr و هم چنین جهت مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج حاصل از SCCmec تایپینگ، نوع تایپ ccr موجود در کلاستر ژنی mec نیز با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردید. لذا جهت تعیین ccr تایپ‌های ۱، ۲ و ۳ از پرایمرهای طراحی شده توسط ژانگ و هم کاران(۱۷) در یک آزمون Multiplex-PCR استفاده گردید. جهت تعیین ccr تایپ ۴ از جفت پرایمر طراحی شده توسط Kondo و هم کاران(۱۸) در یک آزمون PCR ساده استفاده گردید. هم چنین جهت تعیین ccr تایپ ۵ از جفت پرایمر طراحی شده توسط Zhang و هم کاران(۱۷) در یک آزمون PCR ساده استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از آزمونهای فنوتیپی و PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی ژن nuc، مؤید صحت شناسایی تمامی سویه ها در آزمایشگاه بیمارستان بود و آزمون ژنتیکی نیز کاملا با آزمون های بیوشیمیایی منطبق بود. نتایج آزمون غربال گری سویه های مقاوم به متی سیلین به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که از مجموع ۲۹۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده، ۱۰۱ سویه (۳۴/۵٪) نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند.

بیش ترین میزان مقاومت سویه های مقاوم به متی سیلین متعلق به آنتی بیوتیک اریترومایسین بود و ۸۹ سویه (۸۸٪) نسبت به آن مقاوم بودند(نمودار ۱). پس از آن بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین (۸۵٪)، کلیندامایسین (۸۴٪)، توبرامایسین (۸۱٪)، کانامایسین (۷۹٪)، آمیکاسین (۷۵) و تتراسایکلین (۷۱٪) مشاهده شد. هیچ کدام از سویه ها نسبت به ۳ آنتی بیوتیک ونکومایسین، لینزولاید و سینرسید مقاومت نشان ندادند. علاوه بر این، سویه ها نسبت به ۲ آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین (۸٪) و کلرامفنیکل (۳٪) نیز از مقاومت بسیار پایینی برخوردار بودند.

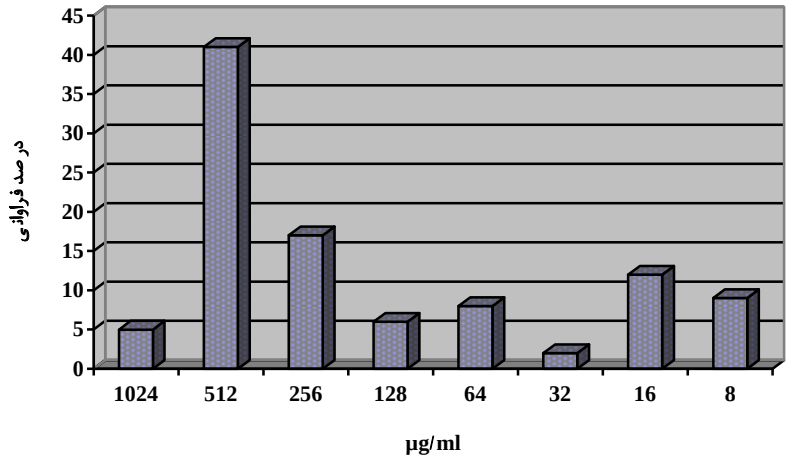
در این مطالعه ۹ سویه نسبت به تمامی آنتی بیوتیک های موجود حساسیت نشان دادند. هم چنین ۳ سویه نیز نسبت به تمامی آنتی بیوتیک ها به استثناء لینزولاید، سینرسید و ونکومایسین (مجموعا ۱۳ آنتی بیوتیک) مقاوم بودند. علاوه بر این، ۸ سویه نیز نسبت به ۱۲ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. اما در مورد ۷ آنتی بیوتیک اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و تتراسایکلین نیز میزان مقاومت ۷۱ درصد (۷۲ سویه) بود.



نمودار ۱. مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

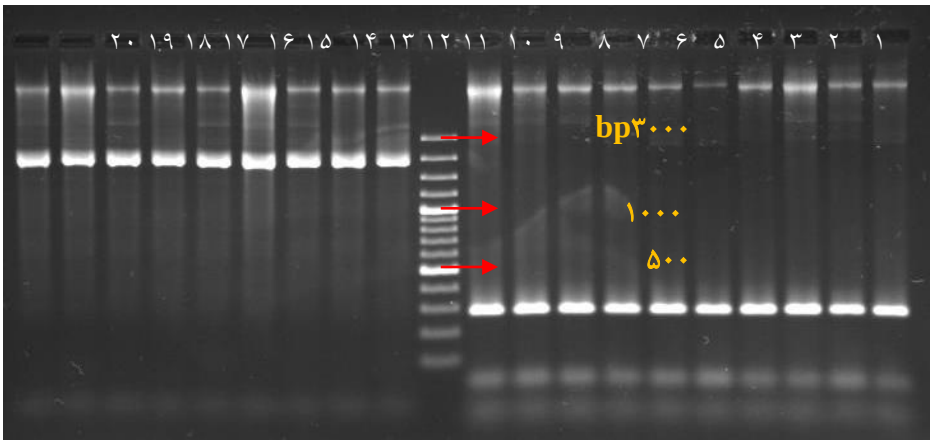
(اختصارات عبارتند از: E, erythromycin; CIP, ciprofloxacin; CD, clindamycin; TN, tobramycin; T, K, kanamycin; AN, amikacin; tetracycline; GM, gentamicin; SXT, cotrimoxazole; RA, rifampicin; MN, minocycline; NI, nitrofurantoin; FC, fusidic acid; C, chloramphenicol, LZD, linezolid; SYN, synercid; V, vancomycin)

تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین مقاومت نشان دادند و هیچ کدام از سویه ها از مقاومت کاهش یافته یا حد واسط برخوردار نبودند. بدین ترتیب که، ۵ درصد سویه ها نسبت به بالاترین غلظت آنتی بیوتیک اگزاسیلین(۱۰۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر) مورد استفاده در این مطالعه مقاومت نشان دادند. هم چنین ۴۱ درصد سویه ها نیز نسبت به غلظت ۵۱۲ µg/mlمقاومت نشان دادند. به طور کلی ۷۰ درصد سویه ها از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند(MICبرابریا بیش از ۱۲۸میکروگرم بر میلی لیتر) علاوه بر این، ۹ درصد سویه ها از حداقل سطح مقاومت(MICبرابر یا بیش از ۸ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. در ۲۱ درصد سویه ها نیز مقاومت معمولی(MIC بین ۱۶ تا ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به متی سیلین مشاهده گردید(نمودار ۲).



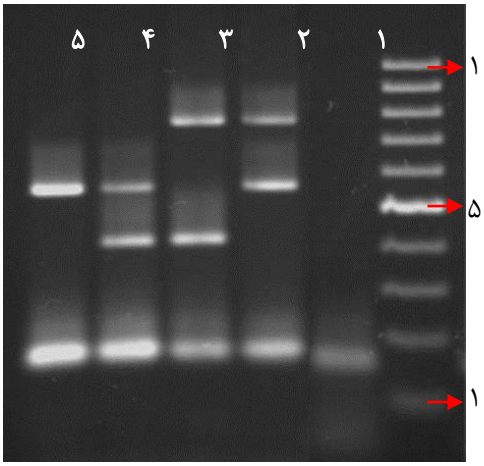
نمودار ۲. نتایج آزمون حداقل غلظت مهار کننده آنتی بیوتیک اگزاسیلین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

ژن mecA با وزن مولکولی ۳۱۰ جفت باز در تمام سویه های (۱۰۰٪) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی گردید. بنابراین نتایج حاصل از آزمون PCR به طور کامل منطبق بر نتایج حاصل از آزمون های تعیین حساسیت میکروبی به روش دیسک دیفیوژن و MIC بود. تمام جدایه ها واجد ccr تایپ ۳ و SCCmec تایپ III بودند (تصویر ۱). هیچ کدام از سویه ها واجد SCCmec تایپ IV و تایپ ۲ ccr به عنوان شاخص سویه های CA-MRSA نبودند.



تصویر ۱. SCCmec تایپ ۳ و تایپ ۳ ccr در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. ۱۱: نشانگر bp ۳۰۰۰. ۱: کنترل مثبت SCCmec تایپ III.۱۰-۲: SCCmec تایپ III در نمونه های مربوط به جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس. ۱۲: کنترل مثبت تایپ ۳ ccr. ۲۰-۱۳: تایپ ۳ ccr در نمونه‌ها مربوط به جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس.

بر اساس نتایج حاصل از پروفاژ تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۲ پروفاژ تایپ SGB و SGF و هم چنین ۲ ساب تایپ SGFa و SGFb در میان جدایه ها شناسایی شد(تصویر ۲). بدین ترتیب که، پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb در ۱۰۰ درصد سویه ها و پروفاژ تایپ SGB در ۳۱ درصد سویه ها مشاهده شد. به طور کلی ۲ الگو در میان ۱۰۱ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مشاهده گردید و الگوی شماره ۲ به عنوان الگوی غالب (۶۹ درصد) در میان سویه های جدا سازی شده از شهر اصفهان معرفی گردید. در این مطالعه هیچکدام از سویه ها واجد پروفاژ تایپ های SGA، SGD و SGL نبودند(جدول ۱).



تصویر ۲. آزمون Multiplex-PCR جهت شناسایی پروفاژ تایپهای مختلف. ۱: نشانگر bp ۱۰۰۰. ۲: ساب تایپ SGFb. ۳: سویه کنترلی واجد پروفاژ تایپهای SGA، SGF و ساب تایپ SGFa. ۴: سویه کنترلی واجد پروفاژ تایپهای SGA، SGB و SGF. ۵ و ۶: سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

جدول ۱. فراوانی الگوهای مختلف پروفاژ تایپ در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین.

الگو	SGB	SGF	SGFa	SGFb	فراوانی
۱	+	+	+	+	٪۳۱
۲	–	+	+	+	٪۶۹

بحث

در این مطالعه شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در یک بیمارستان در شهر اصفهان، ۳۴/۵ درصد تعیین شد. آمارهای متفاوتی از شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در اختیار می باشد. در شیراز در طی ۲ مطالعه در طی سال های ۲۰۰۴ و ۲۰۱۱ میزان شیوع سویه های مقاوم به ترتیب ۹۰ و ۳۸ درصد بوده است(۱۹, ۲۰). محققین مختلفی در طی چندین مطالعه در شهر تهران میزان مقاومت نسبت به متی سیلین را در طی سال های ۱۳۸۳ تا ۱۳۹۱ از ۱۹/۵ تا ۹۰ درصد گزارش کرده اند(۱۵, ۱۶, ۲۱-۲۸). در همدان نیز در سال ۲۰۰۷ میزان شیوع سویه های مقاوم به متی سیلین ۳۱/۴ درصد بود(۲۹). در کاشان، شجری و منیری میزان مقاومت را در طی ۲ مطالعه مختلف به ترتیب ۹۶ و ۶۰ درصد گزارش کرده اند(۳۰, ۳۱). در اصفهان نیز میزان شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، ۲۰ درصد بود(۳۲). فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در اصفهان تا حدودی منطبق بر مطالعات سایر شهرها و در پاره ای از موارد بسیار کم تر از سایر گزارشات است، که احتمالا ناشی از رعایت دقیق استانداردهای اعلام شده از جانب CLSI، استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی استاندارد خارجی و هم چنین تعیین MIC سویه های مقاوم به متی سیلین است. اما در مقایسه با دیگر مطالعه ای که در اصفهان در طی سال ۲۰۱۱ به انجام رسیده است میزان مقاومت به متی سیلین افزایش پیدا کرده است. بنابراین به نظر می رسد که میزان شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در طی ۲ سال در شهر اصفهان از ۲۰ درصد به ۳۵/۵ درصد رسیده است، که نشان دهنده شیوع روز افزون مقاومت در مراکز درمانی است. شاید یکی از دلایل این میزان افزایش در این مطالعه ناشی از نوع نمونه ها باشد که تمامی آنها از بیماران بستری در بیمارستان جداسازی شده اند و به عبارت دیگر تمامی آنرا سویه های HA-MRSA تشکیل می دهند و هیچ کدام از سویه ها از بیماران سرپایی مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان جدا سازی نشده اند.

شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در عربستان سعودی و هند به ترتیب ۸ و ۴۴ درصد گزارش شده است(۳۳, ۳۴). میزان مقاومت در ژاپن، سنگاپور و تایوان بیش از ۶۰ درصد و در ایتالیا و پرتغال بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است(۳۵). در سال ۲۰۰۷ شیوع مقاومت نسبت به متی - سیلین در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در سراسر آفریقای جنوبی ۳۶ درصد گزارش شده است(۳۶). این در حالی است که میزان مقاومت در برزیل و رومانی به ترتیب ۲۶/۳ و ۴۱/۹ درصد بوده است(۳۷, ۳۸). در سال ۲۰۰۶ از ۲۶۵۲ جدایه استافیلوکوکوس ارئوس جدسازی شده در استرالیا، ۳۹۵ (۱۴/۹ درصد) مقاوم به متی‌سیلین بودند(۳۹).

تفاوت هایی که در میزان مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک ها در کشورهای مختلف و یا در بیمارستان های مختلف یک کشور مشاهده می شوند، به دلیل تفاوت هایی است که در سیاست های درمان بیماران و یا کنترل بهداشت بیمارستان به کار گرفته می شوند. روش های مختلف کشت و جداسازی، سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، تفاوت های جغرافیایی و جمعیت های مورد مطالعه نیز باعث تفاوت در آمارهای ارائه شده می شوند. هم چنین مواردی مانند تجویز نامناسب و فراوان آنتی - بیوتیک ها در عفونت های غیرباکتریایی، کامل نشدن دوره درمان و در دسترس بودن آسان آنتی بیوتیک ها به ظهور و گسترش جدایه های چندمقاومتی کمک می‌کند. آنتی بیوتیک هایی که به عنوان خطوط بعدی درمان، انتخاب و تجویز می شوند اغلب گران‌تر و در مواردی نیز سمی هستند.

در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین مشاهده گردید و پس از آن نیز مقاومت نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها از قبیل سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و تتراسایکلین بیش از ۷۰ درصد بود و بنابراین می توان اذعان داشت این آنتی بیوتیک ها و به ویژه اریترومایسین، سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین نمی توانند اثرات قابل ملاحظه درمانی داشته باشند. در ایران از آنتی بیوتیک های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین به طور گسترده‌ای استفاده می شود و همین امر می تواند دلیلی جهت افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها باشد. هم چنین برخی مطالعات نشان می دهند که امکان انتقال پلاسمیدهای مقاومت به تتراسایکلین در میان بسیاری از گونه ها و جنس های مختلف باکتریای وجود دارد(۲۸)؛ این مقاومت حتی از جدایه های حیوانی نیز به جدایه های انسانی قابل انتقال است. این آنتی بیوتیک امروزه جهت مصارف دامی به عنوان یک افزودنی به غذای دام ها استفاده می شود. علاوه بر ونکومایسین که پیش تر اشاره گردید، جنتامایسین نیز از جمله آنتی بیوتیک های مؤثر بر علیه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین است.

تمامی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیک های سینرسید، کلرامفنیکل، لینزولید و ونکومایسین حساسیت کامل داشتند و هیچ گونه مقاومتی نسبت به این آنتی بیوتیک ها در میان جدایه های بالینی مشاهده نشد. در شیراز نیز نشان داده شد که تمامی جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های سینرسید، لینزولید و ونکومایسین، حساس بودند(۲۰).

در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا سازی شده در این مطالعه، ۷۰ درصد سویه ها از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند و حتی در ۵ درصد سویه ها این مقاومت بسیار بالا بود. در سایر مطالعاتی نیز که در کشور به انجام رسیده است سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند(۱۵, ۱۶, ۲۴-۲۷, ۴۰). در سوییس نیز در سال ۲۰۰۹، در ۴۲ درصد از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مقاومت به اگزاسیلین بالا بود(۴۱). وجود جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با حداقل غلظت مهارکننده بالا که ناشی از تجویز بی رویه و مصرف خود سرانه دارو است، در صورت عدم اجرای برنامه‌های مناسب در جهت نظارت بسیار بیش تر بر تجویز و مصرف دارو، عواقب بسیار ناگواری از قبیل افزایش عفونت های مقاوم به دارو، افزایش هزینه های درمان، نیاز به نسل های جدیدتر آنتی بیوتیک با قیمت‌های بالاتر و عوارض بیشتر را به هم راه خواهد داشت.

در این مطالعه ۳ پروفاژ تایپ و ۲ ساب تایپ در میان جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شدند و در مجموع نیز تنها ۲ الگوی پروفاژی تعیین گردید. برخلاف سایر مطالعاتی که در کشور به انجام رسیده است(۱۵, ۱۶) هیچ کدام از سویه ها واجد پروفاژ تایپ SGA نبودند. در جمهوری چک نیز ۵ پروفاژ تایپ و ۹ الگوی پروفاژی شناسایی گردید(۱۴). در ایالات متحده نیز ۶ پروفاژ تایپ و ۱۰ الگوی پروفاژی شناسایی گردید(۴۲). در ایران نیز در طی ۲ مطالعه در شهر تهران ۵ پروفاژ تایپ معرفی شده است(۱۵, ۱۶).

بر اساس نتایج به دست آمده از SCCmec و ccr تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تنها SSCmec تایپ III و تایپ ۳ ccr که شاخص سویه های HA-MRSA هستند، مشاهده گردید. بنابراین تایپ III این کاست، به عنوان تایپ غالب در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در اصفهان معرفی گردید. در مطالعه ای دیگر در شهر تهران در سال ۲۰۰۹، ۹۴ درصد از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین واجد SCCmec تایپ III و ۶ درصد نیز واجد SCCmec تایپ IV شناسایی شدند(۲۳). در سال ۲۰۱۰ در چین، نرخ SCCmec type III در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان، ۹۸ درصد بود(۴۳). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۶ که بر روی ۶۱۵ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شده از ۱۱ کشور آسیایی، ۶۰ درصد جدایه‌ها واجد SCCmec تایپ III و ۳۴ درصد نیز واجد SCCmec تایپ II بودند(۴۴). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در کره جنوبی بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه صورت گرفت، فراوانی SCCmec تایپ‌های II و III و IV به ترتیب ۳۰، ۲۵ و ۴۳ درصد بود(۴۵).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده وجود و تداوم گروههای کلونال و بسیار مقاوم جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهر اصفهان می باشند. هم چنین الگوهای پروفاژی متفاوتی نیز در میان جدایه های به دست آمده مشاهده گردید که خود می تواند نشان دهنده تولید و بیان بسیاری از عوامل حدت در این جدایه ها باشد. شیوع بالای جدایه های بسیار مقاوم و چند مقاومتی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان در جامعه، به عنوان مخازن بزرگ انتروتوکسین‌ها و بسیاری از عوامل حدت دیگر نیازمند تشخیص صحیح و اقدامات کنترلی موثر و سریع جهت پیش گیری و کنترل جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیمارستان ها است. لذا در صورتی‌که توجهات لازم جهت حذف و یا کاهش این جدایه ها در جامعه مبذول نشود، در آینده با شیوع بیش تر و عواقب جبران ناپذیر این جدایه-های بالقوه بیماری زا روبرو خواهیم بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فنآوری دانشگاه اصفهان در قالب اعطای پژوهانه به اعضای هیأت علمی جدید دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس گزاری خود را از جناب آقای دکتر محمد ربانی معاونت پژوهشی و فن آوری دانشگاه اصفهان اعلام می نمایند.

REFERENCES

1. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. The Journal of clinical investigation. 2009;119(9):2464.

2. van Belkum A. Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. Current opinion in infectious diseases. 2006;19(4):339-44.

3. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. Polish Journal of Microbiology. 2011;60(2):95-103.

4. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cellular and molecular life sciences. 2010;67(18):3057-71.

5. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology. 2009;7(9):629-41.

6. Deurenberg R, Vink C, Kalenic S, Friedrich A, Bruggeman C, Stobberingh E. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology and Infection. 2007;13(3):222-35.

7. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(10):4352-9.

8. Wu SW, De Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the mecA gene homologue of Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology. 2001;183(8):2417-24.

9. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A ,et al. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2010;9(1):23.

10. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2006.

11. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2006.

12. Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk .Zoonoses and public health. 2008;55(6):313-9.

13. McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. Journal of clinical microbiology. 2006;44(3):1141-4.

14. Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, et al. Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus. Archives of virology. 2004;149(9):1689-703.

15. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage Typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2012;6(1):80-5.

16. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Iran. Archives of virology. 2012;157(9):1807-11.

17. Zhang K ,McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(10):5026-5033.

18. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(1):264-74.

19. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. Iranian Biomedical Journal. 2004;8(4):173-8.

20. Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, et al. Characterization of SCCmec types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in southern Iran .Japanese Journal of Infectious Diseases. 2011;64(1):28-33.

21. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. Medical Principles and Practice. 2008;17(5):432-4.

22. Aminzadeh Z, Mastari Farahani A, Gachkar L. Prevalence of Staphylococcus aureus careers in chronic hemodialysis patients referred to hemodialysis ward in Dr. Labbafinejad hospital and detection of antimicrobial resistance pattern. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2004;9:23-8.

23. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Analysis and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates in Tehran, Iran. Microbial Drug Resistance. 2008;14(3):217-20.

24. Javan E, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, Pourshafie MR. Study of mecA gene among high level oxacillin resistance Staphylococcus aureus strains isolated from Tehran hospitals. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2010;15:17-22.

25. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus Isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):144-9.

26. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among Staphylococcus spp. with emphasis on detection of mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

27. Rahimi F, Pourshafie MR, Bouzari M, Katouli M. Antibiotic resistance pattern and detection of mecA gene among Methicilin Resistant Staphylococcus aureus isolated from Tehran hospitals in 2008-2011. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine. 2012;57:39-45.

28. Vahdani P, Saifi M, Aslani MM, Ali AA, 37-44. SK. Antibiotic resistance patterns in MRSA isolated from patients admitted in ICU infectious ward. Tanaffos. 2004;3:37-44.

29. Zamani A, Sadeghian S, Najafi Mosleh M, Goudarzi M, Yousefi Mashouf R, Ghader Khani J. Detection of methicillin-resistance (mecA) gene in Staphylococcus aureus strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. Nasim Danesh. 2007;57:273-6.

30. Moniri R, Shafiee M. The survey on prevalence and risk factors for antibiotic-resistant Staphylococcus aureus isolated from samples in Kashan hospitals. Journal of Zanjan University of Medical Science. 2008;16:73-82.

31. Shajari GR, Moniri R. Antibiotic susceptibility and resistance pattern of Staphylococcus aureus isolated from samples sent to central laboratory of Kashan. Feiz. 2002;6:31-6.

32. Havaei SA, Vidovic S ,Tahmineh N, Mohammad K, Mohsen K, Starnino S, et al. Epidemic methicillin-susceptible Staphylococcus aureus lineages are the main cause of infections at an Iranian university hospital. Journal of clinical microbiology. 2011;49(11):3990-3.

33. Al-Tawfiq JA .Incidence and Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection in a Saudi Arabian Hospital, 1999-2003. Infection control and hospital epidemiology. 2006;27(10):1137-9.

34. Tyagi A, Kapil A, Singh P. Incidence of methicillin resistant Stahylococcus aureus (MRSA) in pus samples at a tertiary care hospital, AIIMS, New Delhi. J Indian Acad Clin Med. 2008;9(1):33-5.

35. Lim J-A, Kwon A-R, Kim S-K, Chong Y, Lee K, Choi E-C. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002;49(3):489-95.

36. Brink A, Moolman J, da Silva MC, Botha M. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. South African Medical Journal. 2008;97(4):273-9.

37. Dorobăţ O, Moisoiu A, Tălăpan D. Incidence and resistance patterns of pathogens from lower respiratory tract infections (LRTI). Pneumologia (Bucharest, Romania). 2007;56(1).

38. Nunes APF, Teixeira LM, Bastos CCR, de Souza Fonseca L, dos Santos KRN. Susceptibility of Brazilian staphylococcal strains to glycopeptides evaluated by different testing methods. Current microbiology. 2002;44(6):385-90.

39. Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC, O Brien FG, Christianser K, Turnidge JD, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the Australian community: an evolving epidemic. Medical journal of Australia. 2006;184(8):384.

40. Ekrami A, Samarbafzadeh A, Alavi M, Kalantar E ,Hamzeloi F. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus species isolated from burn patients in a burn center, Ahvaz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2011;3(2):84-91.

41. Ender M, Burger S, Sokoli A, Zbinden R, Berger-Bächi B, Heusser R ,et al. Variability of SCCmec in the Zurich area. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 2009;28(6):647-53.

42. Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of Staphylococcus aureus. J Young Invest. 2006;15:1-8.

43. Peng Q, Hou B, Zhou S, Huang Y, Hua D, Yao F, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. African Journal of Microbiology Research. 2010;4(9):844-8.

44. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(3):1001-12.

45. Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH, et al. A survey of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Korea. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60(5):1108-14.