دوره ۲۱، شماره ۶۵، بهار ۱۳۹۷، صفحات: ۶۹-۵۹

مقاله پژوهشی

تعیین تیپ‌های کاست کروموزومی ژن *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری

حمید شهابی[۱]، حسن ممتاز[۲*]، الهه تاجبخش[۳]

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۳] دانشیار، دکترای تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

چکیده

مقدمه: از آنجایی که استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس مهم‌ترین گونه از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی می‌باشد و عفونت‌های مختلف بیمارستانی از جمله عفونت‌های دستگاه ادراری را ایجاد می‌کند، توجه به الگوی مقاومتی این ارگانیسم به‌ویژه مقاومت به متی‌سیلین از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاوت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس جداسازی‌شده از نمونه‌های ادراری در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ نمونه ادرار از افراد مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری (در حجم ۲۰ میلی‌لیتر) در ظرف استریل نمونه‌گیری ادرار از بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری گرفته شد و به روش کشت میکروبی و مولکولی آزمایش گردید. پس از تأیید مولکولی ایزوله‌های جداشده از آزمایش انتشار دیسکی ساده جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) به‌منظور تعیین تیپ‌های کاست کروموزومی ژن mecA استفاده شد.

یافته‌ها: از میان نمونه‌های مورد بررسی، ۲۳ نمونه (۴۶ درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس بودند و بر مبنای آزمایش PCR واجد ژن 16srDNA شناخته شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این نمونه‌ها به روش آنتی‌بیوگرام مطابق با معیار CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) تعیین گردید. تمام ایزوله‌های مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند که در این میان بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۵/۶۵ درصد) و تتراسایکلین (۹۱/۳۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین (۳۴/۷۸ درصد) بود. همچنین، ۷۳/۹۱ درصد از ایزوله‌ها حامل ژن mecA بودند که تیپ SCCmecIII با فراوانی ۴۷/۰۵ درصد شایع‌ترین تیپ کاست کروموزومی ژن mecA در ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین بود.

نتیجه‌گیری: شیوع مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های خطوط اول و دوم درمانی در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس نشان‌دهنده پراکندگی و انتشار این سویه‌ها در بیمارستان‌های استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد و لازم است که داروی مورد نیاز براساس نتیجه آنتی‌بیوگرام انتخاب گردد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس*، تیپ‌های *SCCmec*، عفونت‌های دستگاه ادراری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

* **نویسنده مسئول:** حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴؛ ایمیل: hamomtaz@iaushk.ac.ir، hamomtaz@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بخشی از فلور طبیعی انسان هستند که گاهی ایجاد عفونت می‌کنند که این امر اغلب ناشی از کاربرد قطعات مصنوعی در بدن (مانند مفصل مصنوعی، شنت‌ها (Shunts) و کاتترهای (Catheters) داخل وریدی) به‌ویژه در افراد خیلی جوان یا مسن و یا افراد دچار نقص ایمنی می‌باشد. حدود ۷۵ درصد از عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی توسط *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* ایجاد می‌شود. مقاومت به نفیسیلین، متی‌سیلین و اگزاسیلین مستقل از تولید بتالاکتاماز است. مقاومت نسبت به نفی‌سیلین به وسیله یک توالی از ژن‌ها در ناحیه‌ای از کروموزوم *استافیلوکوکوس* به نام ناحیه *mec* از مجموعه کروموزومی استافیلوکوک *SCCmec* رمزدهی و تنظیم می‌شود. ژن *mecA* در این جایگاه به‌طور ویژه نوعی پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین *PBP2a* (Penicillin Binding Protein 2a) را رمزدهی می‌کند که مسئول بروز مقاومت دارویی است. تاکنون پنج تیپ و چهار ساب‌تیپ شایع *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) براساس ترکیب کمپلکس *mec* متمایز شده‌اند که دارای اندازه‌های متفاوتی بین ۲۰/۹ تا ۶۶/۹ کیلوباز می‌باشند؛ *SCCmec*I ۳۴/۳ کیلوباز، *SCCmec*II ۵۳ کیلوباز، *SCCmec*III ۶۹/۹ کیلوباز، *SCCmec*IV ۲۰/۹ تا ۲۴/۳ کیلوباز و *SCCmec*V ۲۸ کیلوباز. تیپ‌های I، II و III با عنوان "سویه‌های مرتبط با بیمارستان" HA-MRSA (Healthcare-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*)، تیپ‌ها و ساب‌تیپ‌های IV و V با عنوان "سویه‌های مرتبط با جامعه" CA-MRSA (Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus*) نامیده می‌شوند (۱). انواع I، II و III با عفونت‌های بیمارستانی مرتبط بوده و ممکن است حاوی ژن‌های کدکننده مقاومت نسبت به سایر داروهای ضد میکروبی باشند. نوع VI نیز که به‌طور عمده در سویه‌های MRSA اکتسابی از جامعه CA-MRSA یافت می‌شود، مقاومت کمتر و انتقال‌پذیری بیشتری دارد و مسئول بروز همه‌گیری‌هایی در چند دهه گذشته در ایالات متحده و چند کشور اروپایی بوده است (۲). *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* یکی از عوامل شایع ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری (Urinary Tract Infection) می‌باشد که در چند سال اخیر نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری‌های عفونی مقاوم شده است. عفونت‌های دستگاه ادراری در سراسر جهان به‌طور گسترده‌ای شیوع داشته و در تمام ایام سال و در بین کلیه اقشار جامعه در هر سن و جنسی به وقوع می‌پیوندد و همین امر باعث شده است که در سال‌های اخیر به عفونت‌های دستگاه ادراری توجه زیادی بشود (۳). امروزه بیشترین نمونه‌هایی که جهت کشت و تشخیص عفونت‌های میکروبی به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی آورده می‌شوند، نمونه‌های ادراری هستند (۳). عفونت‌های دستگاه ادراری (UTI) ناشی از باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی انسان در بین تمام گروه‌های سنی می‌باشند و در صورت عدم درمان به موقع و مناسب می‌توانند عواقب خطرناکی داشته باشند (۴). در این راستا، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی مقاومت به متی‌سیلین در *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* و تعیین تیپ‌های مختلف کاست کروموزومی ژن *mec* در ایزوله‌های جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری انجام شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی- توصیفی که در فاصله زمانی

فروردین تا مهر ۱۳۹۶ در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری انجام شد، ۵۰ نمونه ادرار از افراد مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری (در حجم ۲۰ میلی‌لیتر) از بیماران بستری در بیمارستان‌های سطح استان در ظرف استریل نمونه‌گیری ادرار اخذ گردید و جهت جداسازی *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد انتقال داده شد.

از رسوب حاصل از سانتریفیوژ ۲۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جهت کشت میکروبی استفاده گردید.

نمونه‌ها به‌صورت خطی در محیط بلاد آگار کشت داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها در محیط بلاد آگار (Merck، آلمان) از کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس*، اسمیر تهیه گشت و تحت رنگ‌آمیزی گرم قرار گرفت. شایان ذکر است که در صورت مشاهده کوکسی‌های خوشه‌ای گرم مثبت، این کلنی‌ها برای آزمایشات بیوشیمیایی تأیید گونه *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* شامل: تست کواگولاز لوله‌ای، کشت در محیط برد پارکر (Merck، آلمان) و کشت در محیط مانیتول سالت آگار (Merck، آلمان) به‌صورت خطی در محیط بلاد آگار کشت داده شدند (۵،۶).

کلنی‌های کواگولاز منفی و مانیتول منفی واجد همولیز که کلنی سیاه در محیط برد پارکر ایجاد نکردند به‌عنوان کلنی *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* انتخاب گردیدند و برای مطالعات بعدی در محیط BHI (Brain Heart Infusion) مایع (Merck، آلمان) کشت داده شدند.

از باکتری‌های رشدیافته در محیط BHI در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه رسوب‌گیری شد و مطابق با دستورالعمل کیت Genomic DNA Purification (Fermentas ،Lithuani)، DNA ژنومی از باکتری استخراج گردید.

پس از استخراج DNA با استفاده از زوج‌پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن 16srDNA که در جدول ۱ نشان داده شده‌اند، ایزوله‌های جداشده *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* با روش PCR تأیید شدند (۷).

تمام ایزوله‌های جداشده *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* برای ردیابی ژن کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین (*mecA*) مورد بررسی قرار گرفتند. تکثیر این قطعه ژنی توسط زوج‌پرایمرهایی که در جدول ۲ نشان داده شده‌اند صورت گرفت (۸).

جهت تعیین تیپ‌های مختلف *SCCmec* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مورد مطالعه از زوج‌پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۳ به روش Multiplex PCR استفاده شد (۸).

شرایط انجام واکنش PCR در هرکدام از سه مرحله فوق در جدول ۴ ارائه شده است.

الکتروفورز محصولات PCR در هرکدام از مراحل فوق روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد محلول رنگی DNA Safe Stain (سینا ژن- ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی یا ۱ کیلوبازی DNA با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً ۱ ساعت انجام شد. ژل مورد نظر توسط دستگاه ترانس لومیناتور UV (Uvitec ،UK) بررسی گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن *16srDNA* جهت تشخیص *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس*

F: 5′-ATGAAAAAGAGATTTTTATCT-3′
R: 5′-GTTTGGTGACACTCTTAAG-3′

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *mecA*

$mecA_1$ (5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3′)
$mecA_2$ (5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3′)

جدول ۳: توالی پرایمرهای استفاده‌شده جهت تعیین تیپ‌های مختلف *SCCmec*

تیپ‌های SCCmec	توالی پرایمرها (۳-۵)	اندازه محصول (جفت باز)
SCCmecI	F:GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R:GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	۶۱۳
SCCmecII	F:CGTTGAAGATGATGAAGCG R:CGAAATCAATGGTTAATGGACC	۳۹۸
SCCmecIII	F:CCATATTGTGTACGATGCG R:CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	۲۸۰
SCCmecIVa	F:GCCTTATTCGAAGAAACCG R:CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	۷۷۶
SCCmecIVb	F:TCTGAATTACTTCAGCTGC R:AAACAATATTGCTCTCCCTC	۴۹۳
SCCmecIVc	F:ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC R:TTGGTATGAGGTATTGCTGG	۲۰۰
SCCmecIVd	F:CTCAAAATACGGACCCCAATACA R:TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	۸۸۱
SCCmecV	F:GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R:TGAAAGGTTGTACCCTTGACACC	۳۲۵

جدول ۴: شرایط انجام واکنش PCR و برنامه حرارتی مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های مورد مطالعه

ژن	برنامه PCR	حجم PCR (۲۵ میکرولیتر)
16srDNA	۱ سیکل ۹۴ درجه ..... ۶ دقیقه ۳۷ سیکل تکراری ۹۴ درجه ..... ۴۰ ثانیه ۶۰ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۷۵ ثانیه ۱ سیکل ۷۲ درجه ..... ۸ دقیقه	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیوم ۲۰۰ میکرومول dNTP (فرمنتاس) ۵/. میکرومول زوج پرایمرهای F و R ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز (فرمنتاس) ۲/۵ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه
mecA	۱ سیکل ۹۴ درجه ..... ۵ دقیقه ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۵۵ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۹۰ ثانیه ۱ سیکل ۷۲ درجه ..... ۷ دقیقه	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیوم ۱۵۰ میکرومول dNTP (فرمنتاس) ۵/. میکرومول زوج پرایمرهای F و R ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز (فرمنتاس) ۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه
SCCmec types	۱ سیکل ۹۴ درجه ..... ۵ دقیقه ۱۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ..... ۴۵ ثانیه ۶۵ درجه ..... ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۹۰ ثانیه ۲۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ..... ۴۵ ثانیه ۵۵ درجه ..... ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۹۰ ثانیه ۱ سیکل ۷۲ درجه ..... ۱۰ دقیقه	۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیوم ۲۰۰ میکرومول dNTP (فرمنتاس) ۵/. میکرومول زوج پرایمرهای F و R ۲ واحد آنزیم DNA پلی مراز (فرمنتاس) ۳ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه

به‌منظور تعیین الگوی آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* از روش انتشار دیسکی ساده (Kirby-bauer) استفاده گشت. در این روش ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* جداشده به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع BHI در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس طبق دستور CLSI (۲۰۱۷) رقتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند از هر ایزوله در محیط مایع BHI تهیه گردید و به‌صورت متراکم در حضور دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل: پنی‌سیلین (۱۰ واحد/ دیسک)، سفازولین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم/ دیسک)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم/ دیسک)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم/ دیسک)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم/ دیسک)، موپیروسین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، ریفامپین (۵ میکروگرم/ دیسک)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم/ دیسک) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم/ دیسک) در محیط جامد مولر هینتون کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. لازم به ذکر است که با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک، مقاومت هر باکتری نسبت به هر آنتی‌بیوتیک تعیین گردید (۹). از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* ATCC 12228 به‌عنوان کنترل کیفی انجام آزمایش استفاده شد.

نتایج

در مطالعه حاضر ۵۰ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری به‌منظور بررسی ویژگی‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مورد ارزیابی قرار گرفت که از این تعداد نمونه، ۲۳ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* بودند. به‌منظور تأیید مولکولی ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی از آزمایش PCR جهت ردیابی ژن 16srDNA استفاده شد که تمام ۲۳ ایزوله واجد این ژن بودند و به‌عنوان *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* تأیید شدند.

در ادامه، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۲۳ ایزوله جداشده به روش آنتی‌بیوگرام مطابق با معیار CLSI تعیین گردید. همان‌گونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، تمام ایزوله‌های مورد مطالعه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند که در این میان بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به دو آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۵/۶۵ درصد) و تتراسایکلین (۹۱/۳۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین (۳۴/۷۸ درصد) بود.

به‌منظور تعیین تیپ‌های مختلف کاست کروموزومی ژن *mecA* (*SCCmec*) ابتدا حضور ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین (ژن *mecA*) در ۲۳ ایزوله مورد مطالعه به روش PCR ارزیابی شد که از جمع ۲۳ ایزوله مورد بررسی، ۱۷ ایزوله (۷۳/۱۰ درصد) واجد ژن مقاومت به متی‌سیلین ($mecA^+$) بودند.

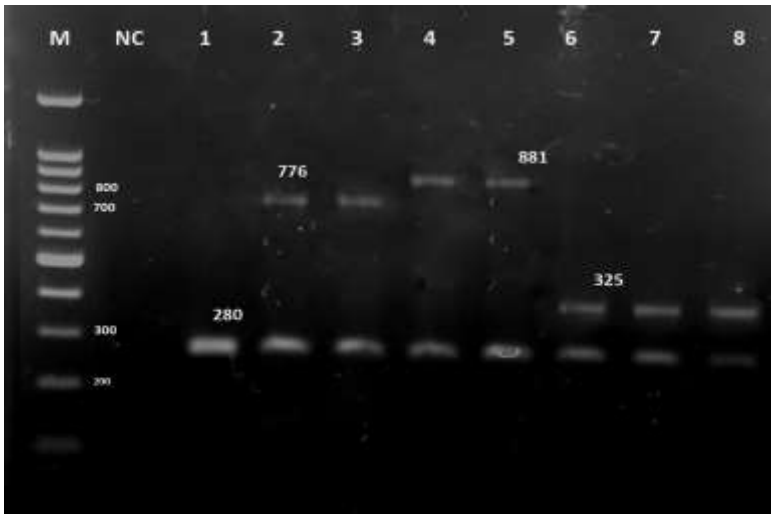
در ادامه تیپ‌های هشت‌گانه *SCCmec* در ۱۷ ایزوله $mecA^+$ به روش PCR چندگانه بررسی گردید. همان‌گونه که در جدول ۶ نشان داده شده است، تنها چهار تیپ

جدول ۵: تعداد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیاری

تعداد ایزوله	آنتی‌بیوتیک										
	پنی‌سیلین	سفازولین	سیپروفلوکساسین	کلیندامایسین	آزیترومایسین	اریترومایسین	موپیروسین	ریفامپین	تتراسایکلین	تری‌متوپریم	نیتروفورانتوئین
۲۳	۲۲	۱۸	۱۶	۱۵	۱۴	۱۹	۱۲	۱۴	۲۱	۱۷	۸

جدول ۶: فراوانی تیپ‌های مختلف کاست کروموزومی ژن *mec* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری در استان چهارمحال و بختیار

تعداد ایزوله $mecA^+$	*mec* III	*mec* IVa	*mec* IVb	*mec* V
۱۷	۸	۳	۲	۴



شکل ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز تیپ‌های مختلف کاست کروموزومی ژن *mec* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* جداشده از عفونت‌های دستگاه ادراری در بیمارستان‌های استان چهارمحال و بختیاری

(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون NC= نمونه کنترل منفی؛ ستون‌های ۸-۱= ایزوله‌های $mecA^+$ واجد قطعه ۲۸۰ جفت بازی مربوط به تیپ III، قطعه ۳۲۵ مربوط به تیپ V، قطعه ۷۷۶ جفت بازی مربوط به تیپ IVa و قطعه ۸۸۱ جفت بازی مربوط به تیپ IVb)

mec III، *mec* IVa، *mec* IVb و *mec* V در ایزوله‌های $mecA^+$ ردیابی شدند (شکل ۱) که به‌ترتیب فراوانی هرکدام از تیپ‌های فوق معادل ۴۷/۰۵، ۱۷/۶۴، ۱۱/۷۶ و ۲۳/۵۲ درصد برآورد گردید.

بحث

در گذشته تصور بر این بود که *استافیلوکوک‌های* کوآگولاز منفی از جمله *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* صرفاً فلور طبیعی بدن انسان بوده و بیماری‌زا نیستند؛ اما بر مبنای مطالعات انجام‌شده که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره خواهد شد و همچنین با توجه به بروز عفونت‌های بیمارستانی و انواع عفونت‌ها توسط این باکتری‌ها به‌ویژه در موارد ضعف ایمنی، فرصت‌طلبی و بیماری‌زایی این میکروارگانیسم‌ها آشکار می‌شود (۱۰). رضوی و همکاران (۲۰۰۶) طی پژوهشی نشان دادند که انواع کوآگولاز منفی *استافیلوکوک‌ها* اغلب در میان پستانداران به‌عنوان همزیست می‌باشند و تاکنون حدود ۴۰ گونه از آن‌ها شناسایی شده و نزدیک به ۱۷ گونه از آن‌ها با انسان در ارتباط هستند که معمولاً غیرهمولیتیک می‌باشند (۱۱). تا سال ۱۹۸۵ تنها ۱۹ سویه از CONS شناخته شده بود و این‌طور عنوان می‌شد که ۸ مورد از آن‌ها در عفونت‌های انسانی نقش دارند و *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* یکی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد (۱۲،۱۳). در این ارتباط، پژوهش حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقایسه مقاومت به متی‌سیلین به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در باکتری *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* جداشده از نمونه‌های ادراری بیماران بستری در بیمارستان‌های استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

تعیین مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی در آزمایشگاه‌های بالینی یکی از مشکلات اساسی بالینی است. در مطالعه حاضر از روش انتشار از دیسک جهت بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین (۹۵/۶۵ درصد) و تتراسایکلین (۹۱/۳۰ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتوئین (۳۴/۷۸ درصد) به‌دست آمد. بررسی‌های مولکولی نیز نشان‌دهنده حضور (۷۳/۹۱ درصد) ژن *mecA* در ایزوله‌های مورد بررسی بود. براساس مطالعات انجام‌شده میزان مقاومت به متی‌سیلین در مناطق مختلف دنیا متفاوت است (۱۴)؛ به‌عنوان مثال میزان باکتریمی ناشی از CONS با سویه‌های نامشخص از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۸۹ از ۹ درصد به ۲۷ درصد افزایش یافته است (۱۵). در این راستا، در مطالعه گسترده‌ای که بین سال‌های ۱۹۹۷-۱۹۹۵ در مورد نمونه‌های کشت خون انجام گرفت، میزان مقاومت به متی‌سیلین در *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز منفی ۵۸ درصد گزارش شد. همچنین طبق گزارشات پایگاه‌های داده‌ها، میزان مقاومت به متی‌سیلین بین سال‌های ۱۹۹۹-۱۹۹۷ در بین کشورهای اروپایی متفاوت بوده و به‌طور کلی در نقاط مختلف دنیا از جمله کانادا، ایالات متحده آمریکا، آمریکای لاتین و اروپا حدود ۷۰ درصد گزارش شده است (۱۶،۱۷).

براساس آمار سیستم ملی نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی، میزان MRSA از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۱، ۱۳ درصد افزایش یافته است. در کشورهای اروپایی این میزان بسیار متغیر بوده و از کمتر از یک درصد در کشورهای شمال اروپا (از قبیل دانمارک و هلند) تا بیش از ۴۰ درصد در کشورهایی نظیر انگلستان، یونان و ایتالیا گزارش شده است. ژاپن در این میان بالاترین شیوع MRSA را در حد ۷۱/۶ درصد دارد (۱۶).

موردی که در مطالعات ذکرشده و دیگر منابع قابل توجه می‌باشد، درصد بالاتر میزان مقاومت به متی‌سیلین و ژن *mecA* در *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* است. همان‌گونه که قبلاً ذکر شد، مقاومت به متی‌سیلین اساساً مربوط به بیان ژن *mecA* است که یک پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین را که یک ترانس پپتیداز با میل ترکیبی پایین برای بتالاکتام‌ها است، کد می‌کند. ژن *mecA* بر روی کاست کروموزومی *استافیلوکوکی* قرار دارد که یکی از عناصر ژنتیکی متحرک (Mobile Genetic Elements) می‌باشد. *استافیلوکوک‌های* کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین ممکن است به‌عنوان یک ذخیره بزرگ *SCCmec* برای *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل نمایند و باعث انتقال ژن مقاومت به آن شوند (۱۸،۱۹).

در سال ۲۰۰۳ Wisplinghoff و همکاران پژوهشی را در ارتباط با *SCCmec* نوع IV غالب در میان نمونه‌های بالینی جداشده از کلون‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* انجام دادند. کاست *SCCmec* از مجموعه‌ای از ۴۴ ایزوله *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین MRSE جداشده بین سال‌های ۱۹۷۳ و ۱۹۸۳ از خون بیماران مبتلا به اندوکاردیت دریچه مصنوعی PVE توسط PCR با ردیابی ژن‌های *mecA* و *mecI* و ژن *IS1272* و *ccrAB* انجام شد. از میان ۴۴ ایزوله جداشده، یک نمونه (معادل ۲ درصد) حاوی نوع *SCCmecI*، ۱۵ نمونه (معادل ۳۴ درصد) حاوی نوع II، ۱۲ نمونه (معادل ۲۸ درصد) حاوی نوع III و ۱۶ نمونه (معادل ۳۶ درصد) حاوی نوع IV بودند. همچنین توالی نوکلئوتیدی کامل از *SCCmec* نوع IV برای ۱۶ نمونه در اندازه kb ۲۴ انجام شد؛ بدین‌معنا که حدود ۹۸ درصد همولوگ با توالی‌های DNA منتشرشده برای *استافیلوکوکوس اورئوس* یکسان است. علاوه‌براین، در سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۱ فراوانی نوع *SCCmec*IV (۵ نمونه از ۱۰ نمونه جداشده) در میان یک مجموعه پراکنده به لحاظ جغرافیایی از *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* در جریان خون

جدا گردید. تعیین توالی در چند ناحیه ژنی MLST با استفاده از ۷ ژن *استافیلوکوکوس اورئوس* به کار گرفته‌شده در این تعیین توالی از این MRSE جداشده و از ۱۰ سویه اخیر به لحاظ پراکندگی جغرافیایی به متی‌سیلین حساس نشان داد که تمامی ۱۶ نمونه که از PVE یا اندوکاردیت دریچه مصنوعی جدا شده‌اند و ۲ مورد از ۵ جدایه‌های اخیر حاوی نوع *SCCmec* IV در سه گروه کلونال مرتبط بودند. همچنین، هر سه *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* حساس به متی‌سیلین اندوکاردیت دریچه مصنوعی جداشده از بیماران بین سال‌های ۱۹۷۶ و ۱۹۷۹ در یک گروه کلونال به‌عنوان نوع *SCCmec* IV MRSE قرار داشتند. این داده‌ها فرضیه انتقال درون و بین گونه‌ای را نشان می‌دهند و بیانگر آن هستند که احتمالاً در کلنی‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* نوع *SCCmec* IV با نوع *SCCmec* ارتباط وجود داشته باشد (۲۰).

در مطالعه حاضر بررسی مولکولی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین نشان‌دهنده حضور ۷۶ درصدی ژن *mecA* در ایزوله‌های مورد بررسی بود که نشان از شیوع مقاومت به متی‌سیلین داشت. دقت روش مولکولی در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبتاً مشابه با نتایج مطالعه انجام‌شده در کشور تونس بود. یافته‌های پژوهش بر روی استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نشان داد که مقاومت به پنی‌سیلین G و متی‌سیلین ۶۰ درصد بوده است. میزان ژن *mecA* نیز ۶۵ درصد گزارش شده بود (۲۱).

در ایران از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سیپروفلوکسایسن، کلیندامایسین و تتراسایکلین به‌طور وسیع جهت درمان بیماران استفاده می‌شود و همین امر می‌تواند دلیلی جهت افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. علاوه‌براین، امکان انتقال پلاسمیدهای مقاوم به تتراسایکلین در میان بسیاری از گونه‌ها و جنس‌های مختلف باکتریایی وجود دارد؛ از این رو بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های استافیلوکوس اپی‌درمیدیس حائز اهمیت است (۲۲).

طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Duran و همکاران در ترکیه انجام شد از میان ۱۳۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۶/۵ درصد مقاوم به متی‌سیلین بودند و ۲۵/۹ درصد از این ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین واجد ژن *mecA* بودند. در مطالعه‌ای مشابه که توسط Cons و همکاران صورت گرفت، ۱۸/۹ درصد از ایزوله‌ها مقاوم به متی‌سیلین بودند و ۲۹/۵ درصد از این ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین واجد ژن *mecA* بودند که این یافته مشابه با مطالعه حاضر به دقت بالای روش مولکولی جهت تشخیص اشاره دارد (۲۳). شجاع و همکاران (۱۳۸۸) نیز مطالعه مشابهی را در این زمینه انجام دادند و در تبریز طی بررسی ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس*، میزان مقاومت به متی‌سیلین را ۸۵ درصد و حضور ژن *mecA* را ۸۹ درصد اعلام کردند. در پژوهش آن‌ها مشخص شد که تمامی ۱۰۰ نمونه به وانکومایسین حساس بوده‌اند (۲۴).

در مطالعات گوناگون اختلاف زیاد میان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین مشاهده شده است که نشان‌دهنده عدم کارایی برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم می‌باشد؛ بنابراین، مقاومت بالای این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و از سوی دیگر بحث مقاومت چند دارویی سویه‌های *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین باعث کاهش مشخص انتخاب‌های درمانی و افزایش احتمال شکست در روند درمان بیماران می‌شود (۲۳).

نتیجه‌گیری

حضور مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های مورد مطالعه در این پژوهش نشانگر

گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اپی‌درمیدیس* می‌باشد و لزوم انجام آنتی‌بیوگرام جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر در درمان و پرهیز از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک در جامعه را بیش از پیش ضروری می‌نماید.

حمایت مالی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها با هماهنگی بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و با رضایت کامل بیماران اخذ شدند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و پژوهش با اطلاع و هماهنگی نویسندگان ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس سهراب صفری تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Bohlouli P, Nahaei MR, Farajnia S, Varshochi M, Ghojazadeh M, Akbari Dibavar M, et al. Cassette chromosome mec typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected from Sina and Imam Reza hospitals of Tabriz. Med J Tabriz Uni Med Sci Health Ser. 2016; 38(4):12-21. [in Persian]
2. Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Adelberg's medical microbiology. 27th ed. New York: McGraw-Hill; 2016.
3. Sharifi Yazdi MK, Soltan Dallal MM. Prevalence study of enterococus and staphylococci resistance to vancomycin isolated from urinary tract infections. Tehran Univ Med J. 2013; 71(4):250-8.
4. Rahimi MK, Falsafi S, Tayebi Z, Masoumi M, Reza Ferasatpour MR, Mirzaei A. Antimicrobial susceptibility pattern of human pathogenic bacteria isolated from patients with urinary tract infection. N Cell Mol Bio J. 2014; 4(15):83-9. [In Persian]
5. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES. Veterinary microbiology and microbial disease. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2011. P. 912.
6. Ramazanzadeh R, Moradi G, Zandi S, Mohammadi S, Rouhi S, Pourzare M, et al. A survey of contamination rate and antibiotic resistant of Gram-negative bacteria isolated from patients in various wards of Toohid and Besat Hospitals of Sanandaj city during 2013-2014 years. Pajouhan Sci J. 2016; 14(3):11-9. [in Persian]
7. Ikeda Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Ishibashi K, Kikuchi K. PCR-based identification of Staphylococcus epidermidis targeting gseA encoding the glutamic-acid-specific protease. Can J Microbiol. 2004; 50(7):493-8.
8. Momtaz H, Hafezi L. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. Bosn J Basic Med Sci. 2014; 14(4):219-26.
9. Watts JL, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
10. Archer GL, Climo MW. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(10):2231-7.
11. Razavi S, Rastgar LA, Ghazi F. Molecular sub typing of coagulase negative staphylococcus by pulse field gel electrophoresis. Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv. 2006; 28(3):53-57. [in Persian]
12. Secchi C, Antunes AL, Perez LR, Cantarelli VV, d'Azevedo PA. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. Braz J Infect Dis. 2008; 12(4):316-20.
13. Sutherland R, Rolinson GN. Characteristics of methicillin-resistant Staphylococci. J Bacteriol. 1964; 87:887-99.
14. Reynolds R, Potz N, Colman M, Williams A, Livermore D, MacGowan A. Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(6):1018-32.
15. Duerden BI, Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections: systematic bacteriology. 9th ed. New York: Hodder Education Publishers; 1998. P. 1501.
16. Sahm DF, Marsilio MK, Piazza G. Antimicrobial

resistance in key bloodstream bacterial isolates: electronic surveillance with the Surveillance Network Database--USA. Clin Infect Dis. 1999; 29(2):259-63.
17. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 2001; 32(Suppl 2):S114-32.
18. Hewitt JH, Coe AW, Parker MT. The detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. 1969; 2(4):443-56.
19. Javadpour S, Karimi E, Karmostaji A. Frequency and anti-biogram pattern of coagulase negative Staphylococcus in clinical specimens of Shahid Mohammadi Hospital in patients, Bandar-Abbas, Iran. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(14):1581-3.
20. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant Staphylococcus epidermidis isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(11):3574-9.
21. Bouchami O, Achour W, Hassen AB. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase-negative Staphylococci other than Staphylococcus epidermidis isolated from various clinical specimens. Afr J Microbiol Res. 2011; 5(11):1298-305.
22. 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. Iran J Clin Infect Dis. 2009; 4(3):143-50.
23. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res. 2012; 135: 389-96.
24. Shojaee S, Nahaie MR, Nahaie M, Farajnia S, Ahangarzadeh RM, Nikvesh S. Study of methicillin-resistance by oxacillin disc diffusion and PCR methods in staphylococcus epidermidis isalates collected from blood cultures and their antibiotic susceptibility. Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv. 2009; 31(1):39-44. [In Persian]

Volume 21, Issue 65, Spring 2018, Pages: 59-69

Original Article

Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Typing of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Urinary Tract Infections in Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran

Hamid Shahabi[1], Hassan Momtaz[2*], Elahe Tajbakhsh[3]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 24 April 2018 **Accepted:** 20 May 2018

Abstract

Introduction: *Staphylococcus epidermidis* is the most important species of coagulase-negative *Staphylococci* and causes various nosocomial infections, such as urinary tract infections. Therefore, attention to the resistance pattern of this organism, especially resistance to methicilin, is of particular importance. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from urine specimens in hospitals of Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran.

Materials and Methods: This study was conducted on 50 urine samples (in volumes of 20 ml) obtained from patients with urinary tract infections from ChaharMahal and Bakhtiari hospitals in sterile containers. The samples were tested by culture and molecular methods. After the molecular confirmation of the isolated strains, a simple disk diffusion test was used to determine the antibiotic resistance pattern. In addition, polymerase chain reaction (PCR) method was employed to determine the Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types.

Results: Out of the 50 samples, 23 specimens (46%) were infected with *Staphylococcus epidermidis*, which had *16srDNA* gene in the PCR test. Antimicrobial resistance pattern was determined according to the Clinical and Laboratory Standards Institute. All isolates had multi-antibiotic resistance. In this regard, the isolates showed the highest resistance to penicillin (95.65%) and tetracycline (91.30%) and the lowest resistance to nitrofurantoin (34.78%). Furthermore, 73.91% of the isolates were the carriers of *mecA* gene. The *SCCmec* III (47.05%) was the most common type of chromosomal cassette *mecA* gene in methicillin-resistant isolates.

Conclusion: The prevalence of resistance to a wide range of antibiotics in the first- and second-line treatment among strains of *Staphylococcus epidermidis* shows the distribution and dissemination of these strains in the hospitals of ChaharMahal and Bakhtiari province. Consequently, it is necessary to select the medication based on the antibiogram result.

Keywords: Antibiotic resistance, SCC*mec* types, *Staphylococcus epidermidis*, Urinary tract infections

**** Corresponding Author:*** Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel : 03833361064; Email: hamomtaz@yahoo.com, hamomtaz@iaushk.ac.ir