مقاومت آنتی بیوتیکی با منشأ احتمالی پلاسمیدی در ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های بالینی

قربان بهزادیان‌نژاد [۱*](Ph.D)، معصومه انوری [۲](M.Sc)

۱ - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی

۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشگاه تربیت مدرس

خلاصه

سابقه و هدف: تاکنون پژوهش‌های زیادی درباره فراوانی مقاومت و منشأ احتمالی آن انجام‌گرفته است. هدف این تحقیق، بررسی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک انتخابی با روش دیسک دیفیوژن و تعیین منشأ احتمالی آنها با حذف پلاسمید به روش مجاورت با میتومایسین C است.

مواد و روش‌ها: سویه‌های مورد آزمایش از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) جدا شدند و در آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از کشت در محیط‌های آگار مغذی و آگار خون دار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد، گرمخانه گذاری شدند و از پرگنه‌ها گستره تهیه، با روش گرم رنگ آمیزی و آزمایش‌های افتراقی کوآگولاز و تخمیر مانیتول DNAase انجام شد. بعد از تهیه سوسپانسیون تلفیقی، آزمایش‌های دیسک دیفیوژن (۱۲ نوع آنتی‌بیوتیک) انجام شد. همچنین با قرار دادن سویه‌ها در مجاورت میتومایسین C، سویه‌های حساس و مقاوم تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که به ترتیب بیشترین فراوانی به اریترومایسین (۶۹/۵٪)، آمپی‌سیلین (۶۴٪)، نیتروفورانتوئین (۵۶/۵٪)، .... وانکومایسین (۳۱/۵٪) بود و با مجاورت دادن سویه‌ها به میتومایسین C سبب کاهش قابل ملاحظه در فراوانی مقاومت‌های تک، دوگانه و چندگانه شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت نسبت به تعدادی آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها مقاومت با فراوانی متفاوت دارد و پلاسمیدها نه تنها در مقاومت به یک عامل بلکه در مقاومت‌های چندگانه نقش بسیار بارزی دارند.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، پلاسمید، میتومایسین C، کوآگولاز.

مقدمه

استافیلوکوک‌ها از سازش پذیرترین و موذی‌ترین ارگانیسم‌های طبیعت‌اند. از این رو در همه جا وجود دارند و عفونت‌های گوناگونی ایجاد می‌کنند [۲]. این باکتری در عفونت‌های بیمارستانی نقش بسیاری دارد و شیوع آن نیز رو به ازدیاد است [۱۵]. در بین سویه‌های جدا شده بالینی این باکتری مقاومت وجود دارد و مکانیسم‌های مختلفی چون انواع جهش‌های (ماکرولزیون و میکرولزیون) کروموزومی و کسب عناصر خارج کروموزومی (ترانسپوزون‌ها، اینتگرین، پلاسمید) مسئول این مقاومت می‌باشند [۱۲،۱۱،۱۰]. پلاسمیدها قدرت جابجایی بسیار زیادی داشته و با توجه به آنکه

* نویسنده مسئول. تلفن: ۸۰۱۱۰۰۱-۰۲۱، فاکس: ۸۰۰۶۵۴۴-۰۲۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

استافیلوکوکوس اورئوس در اندام‌هایی چون پوست، حفره بینی، روده و در آب، هوا، خاک و ... که میکروب‌های فراوان دیگری که حامل پلاسمیدهای با اندازه‌های مختلف هستند، ساکن بوده و در تماس‌اند. بنابراین، امکان دریافت پلاسمیدهای رمزکننده مقاومت را دارند. علاوه بر این، باکتری دائماً در معرض غلظت‌های کم آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارد که به اثبات رسیده موجب بروز ژن‌های خفته مقاومت در پلاسمیدها می‌شوند [۷].

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که پلاسمیدهای کونژوگاتیو و غیر کونژوگاتیو در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگونی را به تنهایی و یا مقاومت‌های چندگانه را رمز می‌کنند [۶]. از این رو، با توجه به چنین اهمیتی هدف این مطالعه مشخص کردن الگوی آنتی‌بیوتیکی این باکتری با حذف پلاسمید و بررسی نقش احتمالی آنها در ایجاد مقاومت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد آزمایش. سویه‌های مورد آزمایش از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) از زمستان ۱۳۷۳ تا زمستان ۱۳۷۴ جدا شد و در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه میکروبیولوژی نگهداری شدند. بعد از کشت در محیط‌های آگار مغذی و آگار خون‌دار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و از پرگنه‌ها گستره تهیه، با روش گرم رنگ آمیزی و آزمایش‌های افتراقی کوآگولاز و تخمیر مانیتول DNAase انجام شد. جهت کنترل کیفی آزمایش‌ها از سویه Staphylococcus aureus ATCC 6832P (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) استفاده شد [۱].

آزمایش‌های دیسک دیفیوژن. بدین منظور از دیسک‌های ۱۲ آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، پنی‌سیلین G، سفالوتین ریفامپین، نیتروفورانتوئین، آمپی‌سیلین، تتراسیکلین و کلیندامایسین و کوتریموکسازول (ساخت کارخانه شرکت پادتن طب) استفاده گردید.

۲ میلی لیتر از سوسپانسیون تلفیقی دارای کدورت ۰/۵ ملک فارلند در سطح محیط مولرهینتون آگار جاری شد و بعد از جذب، دیسک‌ها در سطح محیط قرار داده شدند [۱].

حذف پلاسمیدها با میتومایسین C. بعد از تهیه سوسپانسیون دارای استاندارد، میتومایسین C با غلظت ۱۰ppm به آن اضافه و سوسپانسیون ۴۸ ساعت در RPM۱۵۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید [۱۵] و سپس سوسپانسیون‌به محیط مولرهینتون آگار برای انجام آزمایش دیسک دیفیوژن، مشابه مرحله قبل اضافه شد [۱].

نتایج

از ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، درصد زیادی به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه مقاوم بودند که به ترتیب بیشترین فراوانی به اریترومایسین (۶۹/۵ درصد)، آمپی‌سیلین (۶۴ درصد)، تتراسیکلین

جدول ۱. فراوانی مطلق و نسبی سویه های مقاومی که پس از افزوده شدن میتومایسین C حساس شدند.

آنتی‌بیوتیک	سویه‌های مقاوم	
	تعداد	درصد
آمپی سیلین	۹۲	۷۱/۷۸
سفالوتین	۷۵	۹۴/۹۳
کلرامفنیکل	۱۰۴	۹۲/۲۹
اریترومایسین	۱۱۳	۸۱/۲۹
جنتامایسین	۹۳	۹۱/۱۷
پنی‌سیلین G	۸۳	۸۶/۴۵
تتراسیکلین	۷۵	۶۲/۵
کوتریموکسازول	۴۵	۲۶/۸۷
کلیندامایسین	۵۲	۶۱/۱۸
وانکومایسین	۵	۷/۹۴
نیتروفورانتوئین	۲۰	۱۷/۷۰
ریفامپین	۲۵	۲۲/۹۴

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

جدول ۲. فراوانی مطلق و نسبی سویه‌های مقام و مقاومت‌های دوگانه آنتی‌بیوتیکی در آزمایشهای دیسک دیفیوژن قبل و پس از افزودن میتومایسین C در میان ۲۰۰ سویه جدا شده از نمونه‌های بالینی

نوع مقاومت داروئی	قبل از افزودن میتومایسین c		بعد از افزودن میتومایسین c		درصد تغییرات
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
پنی سیلین + وانکومایسین	۱۹	۹/۵	۱۷	۱۵/۲	۸۹/۴۷
تتراسیکلین + نیتروفورانتوئین	۴۷	۲۳/۵	۳۸	۱۹	۸۰/۸۵
سفالوتین + ریفامپین	۳۶	۱۸	۳۵	۱۷/۵	۹۷/۲۲
جنتامایسین + کلرامفنیکل	۳۸	۱۹	۳۸	۹	۱۰۰
اریترومایسین + کلیندامایسین	۲۳	۱۱/۵	۲۰	۱۰	۸۶/۹۵
ریفامپین + وانکومایسین	۱۷	۸/۵	۱۶	۸	۹۴/۱۱
آمپی سیلین + اریترومایسین	۵۳	۲۶/۵	۵۳	۲۶/۵	۱۰۰
سفالوتین + وانکومایسین	۸	۴	۸	۴	۱۰۰

جدول ۳. فراوانی مطلق و نسبی سویه‌های با مقاومت چند گانه قبل و پس از افزودن میتومایسین C میان ۲۰۰ سویه جدا شده از نمونه‌های بالینی

نوع مقاومت داروئی	قبل از افزودن میتومایسین c		بعد از افزودن میتومایسین c		درصد تغییرات
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
ریفامپین + سفالوتین + پنی‌سیلین	۸	۴	۸	۴	۱۰۰
آمپی‌سیلین + اریترومایسین + تتراسیکلین	۱۷	۸/۵	۱۷	۸	۱۰۰
وانکومایسین + نیتروفورانتوئین + ریفامپین	۶	۳	۳	۱/۵	۵۰

(۶۰ درصد)، نیتروفورانتوئین (۵۶/۵ درصد)، ریفامپین(۵۴/۵ درصد)، کلرامفنیکل (۵۴ درصد)، جنتامایسین (۵۱ درصد)، کوتریموکسازول(۴۸ درصد)، پنی‌سیلین (۴۷/۵ درصد)، کلیندامایسین (۴۲/۵ درصد)، سفالوتین (۳۹/۵ درصد) و وانکومایسین (۳۱/۵ درصد) اختصاص داشت.

از بین آنتی‌بیوتیک‌ها، سفالوتین با حدود ۹۵، کلرامفنیکل ۹۲/۲۹، جنتامایسین ۹۱/۱۷ و پنی‌سیلین G با ۸۶/۴۵، بیشترین مقاومت با منشأ پلاسمیدی و وانکومایسین، نیتروفورانتوئین، ریفامپین و کوتریموکسازول کمترین مقاومت با منشأ پلاسمیدی را داشتند (جدول ۱).

جداول ۲ و ۳ فراوانی مطلق و نسبی سویه‌های مقاوم و مقاومت‌های دوگانه آنتی‌بیوتیکی در آزمایش‌های دیسک دیفیوژن، قبل و پس از افزودن میتومایسین C در میان ۲۰۰ سویه جدا شده از نمونه‌های بالینی را نشان می‌دهد. همان گونه که در جداول مشخص شد پس از افزودن میتومایسین C مقاومت (به یک آنتی‌بیوتیک، دوگانه و چندگانه) به میزان بسیار زیادی کاهش یافت و حتی به صفر رسید.

بحث

۱- نتایج این تحقیق نشان می‌دهد استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها از جمله آمپی‌سیلین، اریترومایسین، سفالوتین، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، وانکومایسین و ... مقاومت دارد، لیکن فراوانی مقاومت در بین آنها بسیار متفاوت است [۲،۱۶].

یافته‌های سایر پژوهشگران نیز موید این مطلب است، اگر چه در میزان شیوع مقاومت، نتایج هریک با دیگری تفاوت‌های بسیار آشکاری وجود دارد که احتمالاً می‌تواند ناشی از:

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

- اختصاصات باکتری‌های بومی هر منطقه.
- تفاوت ماده اولیه و شرایط نگهداری آنتی‌بیوتیک‌ها.
- اسلوب (متدولوژی) به کار گرفته شده باشد.

به هر حال بیشتر مطالعات و یافته‌های این پژوهش موید آن است که در انتخاب بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله آمپی‌سیلین بررسی آزمایشگاهی سویه جدا شده باید مد نظر قرار گیرد.

۲- مطالعات انجام شده بیانگر این واقعیت است که مقاومت پلاسمیدی در باکتری‌ها بیشتر است [۱۳،۱۴] (به نسبت کروموزومی و سایر عناصر خارج کروموزومی) و به دلیل آن که ژن‌های آن ذاتاً تحرک بیشتری برای انتقال دارند، اهمیت زیادی دارد. نقش پلاسمید تقریباً در مقاومت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً بتالاکتام‌ها [۴]، ماکرولیدها [۱]، آمینوگلیکوزیدها [۹]، کلرامفنیکل [۸]، ... به اثبات رسیده است ولی سهمی که در هر گروه آنتی‌بیوتیکی دارد، بسیار متفاوت است.

دراین تحقیق نیز به وضوح نقش احتمالی پلاسمید در مقاومت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک بررسی شده، نمایان و مدلل شد. علاوه بر آن نتایج بدست آمده موید آن است که پلاسمیدها نه تنها در مقاومت به یک عامل، بلکه در مقاومت‌های چندگانه نقش بسیار بارزی دارند (جدول‌های ۱ و ۲ و ۳)، چنانچه در مواردی که مقاومت دوگانه به جنتامایسین و کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و اریترومایسین و نیز وانکومایسین و سفالوتین وجود داشت، پس از افزودن میتومایسین C مقاومت کلاً حذف و به صفر رسید و مقاومت‌های سه گانه نیز تقلیل چشمگیری داشتند. بدین سان، حضور پلاسمیدهای بزرگ و یا چند نوع پلاسمید با ژن‌های رمزکننده صفات گوناگون محرز می‌گردد، زیرا پژوهشگران نشان داده‌اند که معمولاً ژن مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک روی پلاسمیدهای کوچک و ژن‌های مقاومت چندگانه روی چند پلاسمید و یا یک پلاسمید بزرگ قرار دارند [۸]. بطور کلی، می‌توان گفت چون استافیلوکوکوس اورئوس ساکن محیط‌ها و فلور داخلی اعضای است که غنی از فلور باکتریایی مقاوم پلاسمیدی هستند. از این رو، می‌توانند پلاسمیدهای مقاومت را از این باکتری‌ها (سویه‌ها و حتی خانواده‌های مختلف باکتریایی) کسب کرده و از طریق لیز سلولی در اثر درمان و آزاد شدن پلاسمیدها و یا انتقال با مکانیسم‌های وراثتی، آنها را به انواع باکتری‌ها انتقال دهند [۱۶،۱۷]. بنابراین، استافیلوکوک‌ها به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس در انتشار مقاومت بسیار حایز اهمیت‌اند و باید در درمان عفونت‌های ناشی از آن به این مهم توجه بایسته داشت تا فرایند انتقال مقاومت به حداقل کاهش یابد.

منابع

[۱] بهزادیان، ق. روش‌های تشخیص و تفسیر باکتری‌شناسی بالینی، چاپ اول،انتشارات دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، سال ۱۳۷۴، ص ۳۳۹-۲۹۰

[۲] صادقی حسن‌آبادی، ع. اپیدمیولوژی عفونت‌های بیمارستانی، مجله دارو و درمان، اردیبهشت ۱۳۶۵، ص ۳۲ - ۲۶.

[۳] شاهچراغی، ف. بررسی رابطه بین عفونت‌های زخمی و آلودگی اتاق عمل و مطالعه فاکتور مقاومت در باکتری‌های جدا شده، دانشگاه تربیت مدرس، پایان‌نامه، ۱۳۷۵، ص ۶۳-۶۱.

[4] Antonc, A. M., β-lactamases, Br. Med. Bull., 40 (1984) 18-27.

[5] Bernard, W.B., Inducible erythromycin resistance in bacteria, Br. Med. Bull., 40 (1984) 47-53.

[6] Coben, M.L., Wong, E.F. and Comon, R., Plasmid in Staphylococus aureus and Staphylococus epidermidis during nosocomial Staphylococus aureus outbreak, Antimicrob. Agent Chemother., 21 (1984) 210-215

[7] Elsoth, N., Fouace, J.M., Pillert, J. and Chalbert, Y.A., Plasmid DNA content of

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

multiresistant Chloramphenicol strains, Annu. Microbiol., 132 (1981)131-156.

[8] Gaffney, D.F., Cundiffe, E. and Foster , T.J., Chloramphenicol resistance that does not involve Chloramphenicol acetyltransferase encoded by plasmid from gram negative bacteria , J. Gen. Microbiol., 125(1981)113-121.

[9] Gillespie, M.T., Lyon, B.R., Messerotti, L.J. and Skurray, R.A., Chromosom and plasmid mediated gentamicin resistance in Staphylococus aureus encoded by Tn 4001, J. Med. Microbiol., 24(1987) 139-144.

[10] Hachler, H., Berger-Bachi, B. and Kayserf, H., Genetic characterization of a Chromosom difficile erythromycin Staphylococus aureus, Antimicrob. Agents Chemother., 317(1987) 1039-1045.

[11] Sunders, J.R., Genetic and evolution of antibiotic Resistance, Br. Med.l Bull., 40 (1984) 54-60.

[12] Kenneth, H., Mayer, S., Opal, M. and Antone, A.M., Mechanisms of antibiotic resistance in Mandell, Douglas and Bennets principles and practice of infectous diseases, Churchill living stone, Landon, 1995, pp. 212-221.

[13] Lampson, B.C., Von David, W.and Parisi, J.T., Novel mechanism plasmid mediated erythromycin resistance by p NE24 from staphylococus epidermidis, Antimicrob. Agent Chemother., 30 (1986) 653-658.

[14] Levy, S., Antimicrobial resistance: A global perspective, Resistance: A crisis in health care. vol 390, New York, Plenum Press, 1995, pp. 1- 19

[15] Thomas, J.W., Randomized double-blined trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methiceccillin- resistance and effect of host factors on outcome, Antimicrob. Agent Chemother., 37 (1993) 1334-1342.

[16] Utsalos, J., Characterization of hospital and community strains of Staphylococus aureus for resistance to antimicrobial drugs, metallicions, disinfectants, thermal injury and solar radiation, Acta Microbiol. Hung., 33 (1986) 183-189.

[17] Zorbas, I., Hall, S.L., Barners, W.G. and Rogolsky, M., Molecular analyses of conjugative gentamicin-resistance plasmids from Staphylocuccal clinical isolates, Can. J. Microbiol., 34 (1988) 1050-1057.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Antibiotic resistance patterns and plasmid profiles of 200 clinically ioslated Staphyloococcus aureus

G. Behzadiyannejad* (Ph.D) and M. Anvari (M.Sc)

Dept. of Microbiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University,Tehran,Iran

Introduction. Many investigations have, so far, carried out to determine antibiotic resistance pattern and plasmid profiles. The aim of this study was to assess coagulase positive Staphylococcus resistance to 12 selected antibiotics, using disc diffusion and to determine their possible origin, through plasmid deletion, using mitomycin C treatment.

Material and Methods. Bacterial strains were isolated from clinical specimens taken from patients in Imam Khomeini (RAH) hospital and preserved at our laboratory. Being cultured in nutrient and blood agar, they were incubated for 24 hours at $37^{\circ}C$. Gram staining, coagulase and DNAase monitol fermentation tests were done. After preparing inoculating suspention, disc diffusion (12 antibiotics) test was performed. Susceptible and resistant strains were also determined through their treatment with mitomycin C.

Results. The results indicated that antibiotic resistance was the most against erthromycine (89%) and mitomycin C significantly decreased the frequency of single, double and multiple resistant cases.

Conclusion. These findings suggest that coagulase positive, Staphylococcus aureus is resistant, to different degree, to some selected antibiotics. Plasmids not only cause resisance to a antibiotic but also play obvious role in multiple resistance.

Key words: Plasmid; Mitomycin C, Staphyloococcus aureus; Resistance; Antibiotic

* Corresponding author. Fax: 021-8006544; Tel: 021-8011001

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]