ORIGINAL ARTICLE

Phenotypic and Genotypic Determination of Mupirocin Resistance Among Methicillin Susceptibility and Resistance in Staphylococci Isolated from Nosocomial Infections

Sima Hesami[1],
Seyed Davoud Hosseini[2],
Alireza Amouzandeh-Nobaveh[3],
Saber Eskandari[2],
Ehsanollah Ghaznavi-Rad[3,4]

[1] Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic azad University, Qom, Iran
[2] Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak branch, Arak, Iran
[3] Department of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[4] Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received October 21, 2013 ; Accepted February 12 , 2013)

Abstract

Background and purpose: Mupirocin is a topical antibiotic. This antibiotic can inhibit most of gram-positive cocci. Shortly after consuming the antibiotic mupirocin, resistance has emerged. The main purpose of this study was to determine mupirocin resistance in Staphylococcus strains isolated from nosocomial infections in the city of Arak.

Material and Methods: A total of 150 Staphylococcus isolates (sensitive and resistant to methicillin S.aureus, coagulase negative staphylococcus) were subjected to the present study. In this study, 150 isolates of staphylococci were examined. PCR amplification of *Sa442* gene was used as the identification marker for the confirmation of phenotypic diagnosis through biochemical and biological methods. In order to determine the presence of *mecA* gene in *S. aureus* isolates that were resistant to methicillin. All isolates were tested for mupirocin susceptibility by a disc diffusion method according to CLSI guideline. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by an E-test and they were also analyzed by a PCR for the presence of *ileS-1, mupA* and *mupB* genes.

Results: Among the 150 strains examined, 11 isolates were known resistant in disc diffusion and E-test. PCR result indicated that one isolate contains gene *ileS-1*, four isolates contain genes *mupA* and 6 strains containing both genes *mupA* and *ileS-1*. There was no strain that contained genes *mupB* and PCR results were fully consistent with the results of the E-test.

Conclusion: This is a report of low frequency of mupirocin resistance in the city of Arak. This result illustrated that the prescription of mupirocin by physicians in this geographical region is limited. However, incorrect use can lead to rise in resistant rate. In addition, the combination of phenotypic methods and PCR for the detection of resistance to mupirocin is recommended.

Keywords: Staphylococcus aureus, coagulase-negative staphylococci, Resistance, mupirocin, Polymerase Chain Reaction

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(Supple 1): 30-39 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۲ (۳۹-۳۰)

بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ مقاومت به موپیروسین در بین استافیلوکوک های مقاوم و حساس به متی سیلین جدا شده از عفونت های بیمارستانی

سیما حسامی[۱]
سیدداود حسینی[۲]
علی رضا آموزنده نوباوه[۳]
صابر اسکندری[۲]
احسان اله غزنوی راد[۳و۴]

چکیده

سابقه و هدف: موپیروسین یک آنتی‌بیوتیک موضعی می‌باشد. این آنتی بیوتیک مهارکننده فعالیت اغلب کوکوس‌های گرم مثبت می‌باشد. مقاومت به موپیروسین زمان کوتاهی پس از مصرف این آنتی‌بیوتیک ظهور پیدا کرد. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین مقاومت به موپیروسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی شهر اراک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس بررسی شد و با کمک روش های بیوشیمیایی و میکروبی به همراه روش PCR ، سویه ها تأیید هویت شدند. برای تعیین میزان حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک موپیروسین، از روش دیسک دیفیوژن و E-test با دستورالعمل CLSI برای سویه‌ها جدا شده استفاده گردید، حضور ژن ileS-1، mupA و mupB برای تعیین سطح مقاومت به موپیروسین باکمک روش PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از بین ۱۵۰ سویه مورد بررسی، تعداد ۱۱ سویه در دیسک دیفیوژن و E-test مقاوم شناخته شدند و در مرحله PCR یک سویه دارای ژن ileS-1، ۴ سویه دارای ژن mupA و ۶ سویه دارای هر دو ژن mupA و ileS-1 بودند و هیچ سویه‌ای دارای ژن mupB نبود و نتایج PCR کاملاً با نتایج E-test مطابقت داشت.

استنتاج: با وجود این‌که مقاومت به موپیروسین در شهر اراک در سطح پایینی است، ولی مصرف آنتی بیوتیک به صورت صحیح می‌تواند این مقاومت را کاهش دهد. هم‌چنین ترکیب روش‌های فنوتیپی و PCR برای تشخیص مقاومت به موپیروسین توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس کوآگولازمنفی، مقاومت، موپیروسین، واکنش زنجیره ای پلی مراز

مقدمه

استافیلوکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که بر روی پوست و غشاهای مخاطی به وفور حضور دارند، ورود این باکتری‌ها به بدن از میان شکاف‌های پوستی مکرراً رخ می‌دهد. این باکتری‌ها جزء مهم‌ترین عوامل

مولف مسئول: احسان اله غزنوی راد - اراک: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی E-mail:e.ghaznavirad@arakmu.ac.ir
۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم ،ایران
۲. بخش ملکولی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی شعبه مرکزی، اراک، ایران
۳. گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۷/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۸/۳ تاریخ تصویب :۱۳۹۲/۱۱/۲۳

عفونت های بیمارستانی به شمار می‌روند و می‌توانند عفونت‌های سطحی یا عمقی را ایجاد کنند، که بعضاً کشنده بوده یا موجب آسیب‌های گسترده‌ای در بدن می‌شوند(۱). به دلیل حضور فراوان گونه‌های استافیلوکوکوس بر سطح پوست وتلقیح مکرر وسایل خارجی به عنوان عوامل کمکی در بیماران بستری شده، شیوع عفونت‌های ناشی از این جنس بالا می‌باشد(۲). استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی مطرح است(۳). زیستگاه اکولوژیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ناحیه قدامی بینی است(۵،۴). استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط محیطی پایدار مانده و علی‌رغم توانایی عوامل ضد میکروبی قوی و بهبود وضعیت بهداشتی و روش‌های کنترل عفونت این باکتری هنوز یک پاتوژن مهم انسانی به شمار می‌رود(۶).

در سال ۱۹۶۱ اولین استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant MRSA Staphilococcus aureus) در اروپا شناسایی شد. از آن زمان تاکنون به ویژه طی ۲ دهه گذشته، شیوع این سویه در بسیاری از قسمت های جهان افزایش یافته است(۷). البته سویه‌های حساس به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (methicillin susceptible Staphilococcus aureus) MSSA نیز می‌توانند به سایر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم باشند.

سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن مقاومت به متی سیلین (ژن mecA) است. این ژن پروتئینی به نام PBP2a (Penicillin Binding Protein 2a) را کد می نماید(۹،۸).این ژن در سویه‌های MSSA وجود ندارد(۱۱،۱۰). از جمله گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی CoNS (Coagulase-Negativestaphylococci) استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، لودوننسیس، همولیتیکوس، ساپروفیتیکوس، کوهنی و گزیلوسوس است(۱۲) و از جمله بیمارهایی که استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی ایجاد می‌کند. می‌توان اندوکاردیت، عفونت شنت، کاتتر، عفونت مفاصل مصنوعی، عفونت دستگاه ادراری و باکتریمی را نام برد(۱۳).

یکی از آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر کوکوس های گرم مثبت موپیروسین است که به عنوان یک عامل ضدمیکروبی به صورت موضعی استفاده می‌شود(۱۴). امروزه از این آنتی‌بیوتیک برای پیشگیری یا درمان عفونت‌های سطحی پوست نظیر زرد زخم، عفونت‌های زخم‌ها، سوختگی‌ها و حذف ناقلین بینی با استافیلوکوکوس اورئوس در پرسنل بیمارستان و بیماران در بیش‌تر از ۹۰ کشور دنیا استفاده می‌شود(۱۵).

موپیروسین (pseudomonic acid A) مشابه به اسید آمینه ایزولوسین است و با به کار بردن آن از فعال شدن این اسید آمینه توسط ایزولوسیل _tRNA سنتتاز کد شده و به وسیله ژن ileS کروموزمی ممانعت می‌شود و در نتیجه پروتئین سازی باکتری مهار می‌گردد(۱۶). فعالیت موپیروسین علیه پاتوژن‌های گرم مثبت به خصوص به عنوان عامل تخریب‌کننده استافیلوکوک‌ها در بیمارستان‌ها، نسبت به سایر فعالیت‌هایش ترجیح دارد(۱۷). مقاومت در سطح پایین و بالا و بسیار بالا در هر دوگروه استافیلوکوکوس اورئوس و سویه‌های استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی تشخیص داده شده است(۱۵). مقاومت به موپیروسین از لحاظ فنوتیپی به ۳ گروه تقسیم می‌شود:سطح پایین مقاومت با MIC(minimum inhibitory concentration) ۲۵۶-۸ µg/ml و سطح بالای مقاومت با MIC، مساوی و بالاتر از ۵۱۲ µg/ml و سطح بسیار بالای مقاومت با MIC بالای ۱۰۲۴ µg/ml. سطح پایین مقاومت با جهش در ژن کروموزومی ileS-1، سطح بالای مقاومت به کمک ژن (mupA) ileS-2 پلاسمیدی و سطح بسیار بالای مقاومت به کمک ژن mupB پلاسمیدی کد می‌شود(۱۸).

در طی دهه گذشته، علاوه بر مقاومت به موپیروسین در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

حساس به متی‌سیلین و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، مطالعات زیادی در باره ظهور مقاومت نسبت به موپیروسین در بین سویه‌های مختلف استافیلوکوکی از جمله استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی به انجام شده است(۱۷،۱۹،۲۰).

لذا با توجه به گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیک موپیروسین در محدودسازی ناقلین استافیلوکوکوس اورئوس در بینی پرسنل بیمارستان و بیماران به عنوان بخشی از استراتژی جلوگیری از عفونت و وجود گزارش‌های متعدد مبنی بر موفقیت‌آمیز بودن این روش در جلوگیری از عفونت، استفاده از موپیروسین اغلب همراه با سایر روش‌ها در کنترل عفونت استفاده می‌شود(۲۱). هم‌چنین آنتی بیوتیک موپیروسین در درمان زخم‌های موضعی استافیلو کوکی کاربرد فراوان دارد(۱۵). مشاهده مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در ایران و سایر نقاط جهان، مبنای این تحقیق براساس بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی‌بیوتیک موپیروسین همراه با تعیین فراوانی ژن های ileS-1، mupA و mupB با کمک روش PCR (polymerase chain reaction) قرار گرفت(۲۴-۲۲) و در نهایت مقاومت به موپیروسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین (MSSA) و استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی (CoNS) مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی توصیفی بوده که از شهریور ۱۳۹۱ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۲ انجام گرفت. ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس شامل ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین و ۵۰ سویه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی (شامل سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استافیلوکوکوس لودونسیس و استافیلوکوکوس همولیتیکوس) از نمونه‌های بالینی نظیر خون (۳۹ سویه، ۲۶ درصد)، زخم (۴۰ سویه، ۲۶/۶۶ درصد)، ادرار (۲۳سویه، ۱۵/۳۳ درصد)، کاتتر (۴سویه، ۲/۶۶ درصد)، چرک (۳سویه، ۲ درصد)، خلط (۱ سویه، ۰/۶۶ درصد)، ترشحات (۳ سویه، ۲ درصد)، مجرای تنفسی (۲۶ سویه، ۱۷/۳۳ درصد)، آبسه (۳ سویه، ۲ درصد)، عفونت خون (۴ سویه، ۲/۶۶ درصد)، مایع پلور (۳ سویه، ۲ درصد) و CSF (Cerebrospinal fluid) (۱ سویه، ۰/۶۶ درصد) از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بیمارستان‌های مرکز آموزشی شهر اراک جمع آوری گردید.

از افراد شرکت کننده در این طرح فرم رضایت نامه اخذ گردید. با انجام آزمایش‌های فنوتیپی، رنگ‌آمیزی گرم، تخمیر مانیتول، آزمایش کاتالاز، آزمایش DNase، آزمایش کوآگولاز، روش‌های بیوشیمیایی و تست‌های تخمیر قند، تست اورنتین دکربوکسیلاز، تست تولید اوره آز، تست تولید استون، تست احیای نیترات و تست حساسیت به دیسک (novobiocin 5 µg and polymixin B 300 units) تعداد ۱۵۰ نمونه استافیلوکوکوس شناسایی وتعیین هویت شدند(۲۲). سپس آزمایش PCR برای رد یابی ژن Sa442 صورت گرفت که ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی و تعیین هویت شدند. جهت تشخیص فنوتیپی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از دیسک ۳۰ میلی‌گرمی سفوکسیتن و اگزاسیلین ۱۰ میلی‌گرمی طبق دستورالعمل CLSI استفاده گردید که از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۵۰ سویه مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شدند. از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده آزمایش ژنوتیپی PCR برای ردیابی ژن mecA انجام شد که نتایج حاصل کاملاً مشابه آزمایش انتشاردیسک بر روی محیط مولر هینتون آگار بود و همه نمونه‌هایی که به عنوان سویه‌های MRSA شناسایی شده بودند، در این‌جا نیز به عنوان نمونه‌های واجد ژن mecA شناسایی

شـدند(۲۵). از ۱۰۰ نمونـه اسـتافیلوکوکوس اورئـوس شناسایی شده، تعداد ۵۰ نمونه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین MRSAمشخص شدند.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها

روش دیسک دیفیوژن:

بـرای تعیـین الگـوی مقاومـت سـویه‌هـای MRSA، MSSA و CONS، حـساسیت نـسبت بـه موپیروسین مطابق روش انتشار از دیسک کربی- بائر (Kirby–Bauer Disk Diffusion Method) با استفاده از دیـسک آنتـی‌بیـوتیکی ۵ میکروگرمـی موپیروسـین (Mast,UK) و بـا رعایـت اسـتانداردهای (Clinical and laboratory Institute CLSI) صورت گرفت.

نمونـه مـورد نظـر را در محیـط مـولر هینتـون بـراث کشت داده، سپس محیط مورد نظر ۴ ساعت در دمـای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از رشـد بـاکتری در محیط، کـدورتی مطابق بـا کـدورت اسـتاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شـد؛ بـرای ایـن کـار ۵ میلی‌لیتـر سـرم فیزیولوژی را در لوله ریخته و چند قطره از محیط کشت حاوی باکتری تا رسیدن بـه کـدورت مـورد نظـر بـه آن اضـافه گردیـد. از ایـن سوسپانـسیون، روی محـیط مـولر هینتون کشت داده و دیسک آنتـی بیوتیـک موپیروسـین روی محـیط قرارگرفـت. سـپس ایـن محـیط بـه مـدت ۱۸ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قـرار داده شـد. پـس از آن نتـایج بـا توجـه بـهbreakpoint هـای CLSI جهت آنتی‌بیوتیک موپروسین تفسیر شدند و قطـر ناحیـه مهار رشد بـاکتری انـدازه گیـری شـد و بـه سـه صـورت مقـاوم (R)، نیمـه حـساس(I) و حـساس(S) دسـته بنـدی شد(۲۶). برای دیسک موپیروسین معیارها به صورت زیـر بـود: ۱۴ mm یـا بـیش‌تـر حـساس و ۱۳ mm یـا کـم‌تـر مقاوم(۲۷). استافیلوکوکوس اورئـوس ATCC25923 بـه عنوان سویه استاندارد استفاده شد که این سـویه حـساس به موپیروسین است(۲۸).

روش E-test

برای تعیین حداقل غلظـت ممانعـت کننـده از رشـد (MIC) نـسبت بـه آنتـی بیوتیـک موپیروسـین از روش E-test اسـتفاده شـد. نوارهـای E-test موپیروسـین از شرکت Liofilchem, Italy خریداری شد. نوار بـر روی سـطح پلیـت مـولر هینتـون آگـار بـا غلظـت ثـابتی از سوسپانـسیون سـویه‌هـای اسـتافیلوکوکوس‌هـایی کـه کدورت نهایی معادل ۰/۵مک فارلند دارد، قرار گرفـت. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری اگر ایزوله‌ها حـساس باشند، یک هاله مهاری بیضی شکل در رشد بـاکتری بـر روی سـطح پلیـت تـشکیل خواهـد شـد و نقطـه‌ای روی درجه MIC نوار که هاله مهاری آن را قطع می‌کند و بـه عنـوان MIC در نظـر گرفتـه مـی‌شـود و طبـق تعریـف سویه‌هـایی بـا MIC برابـر µ۴ g/ml یـا کـم‌تـر حـساس، µg/ml ۲۵۶–۸ با مقاومـت پـایین و µg/ml ۵۱۲ و بـالاتر با مقاومت بالا و مقاومت بـسیار بـالا بـا µg/ml ۱۰۲۴ بـه موپیروسین شناخته می‌شود(۱۸). به عنوان سویه کنتـرل از اسـتافیلوکوکوس اورئـوس ATCC29213 اسـتفاده شـد که MIC موپیروسین آن ۰/۱۲ است(۲۸).

روش ملکولی PCR

قبل از انجـام PCR، اسـتخراج DNA بـاکتری لازم اسـت؛ کـه بـه ایـن منظـور از روش Salting Out بـرای استخراج ژنوم استافیلوکوک‌ها استفاده شـد(۲۹). غلظـت DNA نمونه‌های حاصل از استخراج با دستگاه Nano drop (thermoScientific 2000) مورد سنجش قـرار گرفـت. پـس از تخلـیص ژنـوم بـاکتری بـه منظـور شناسـایی ژن Sa442 از پرایمرهـای Sa442-Fb و Sa442-Rb و بـرای شناسایی ژن mecA از پرایمرهـای mecA1 و mecA2 و بـرای شناسـایی ژن iles-1 پرایمرهـای lmr1 و lmr2 و برای شناسایی ژن mupA از پرایمرهای mup1 و Mup2 و برای شناسـایی ژن mupB از پرایمرهـای mupB-Fb و mupB-Rb که توالی آن‌ها و طول قطعه تکثیر یافتـه بعـد از PCR در جدول شماره ۱ نشان داده شده، استفاده گردید.

مخلوط نهایی واکنش PCR ۱۲/۵ میکرولیتر بود که شامل(10x) buffer PCR ۱/۲۵ میکرولیتر و ۰/۷۵mgcl2 و DNTPs ۰/۴میکرولیتر و آب مقطر دو بار تقطیر ۷/۹ میکرولیتر و ۱ میکرولیتر از هر جفت پرایمر بود و از DNA الگو ۱ میکرولیتر و در نهایت ۰/۲ میکرولیتر DNA پلی‌مراز Taq بود همه مواد کار رفته از شرکت ایرانی سینا ژن خریداری شد. ویال‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio rad USA PCR C1000)قرار گرفت و با برنامه‌ریزی واکنش انجام گرفت. واسرشتگی اولیه باز شدن دورشته در ۹۵^{oc} به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه حرارتی شامل باز شدن دو رشته در ۹۵^{oc} به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرهای Sa442 در ۵۵^{oc} و mecA در ۵۳^{oc} و *iles-1* و mupA در ۵۱^{oc} و *mupB* در ۵۰^{oc} به مدت ۴۰ ثانیه و ساخت رشته مکمل هدف ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه ویک مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. بعد از اتمام واکنش، ۲ میکرولیتر از مخلوط PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از بافر تریس استات (۱×) به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰ مورد الکتروفورز قرار گرفت و بعد از رنگ‌آمیزی با loading day ایجاد باند به وسیله دستگاه UVI tec Cambridge d5520N مورد مطالعه قرار گرفت. از نشان گر وزن 100bp ladder برای تخمین اندازه قطعه‌ها استفاده شد.

یافته ها

با آزمایش‌های تاییدی فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، تخمیر مانیتول، آزمایش کاتالاز، آزمایش DNase، آزمایش کوآگولاز وروش های بیوشیمیایی وتخمیر قند) و PCR ژن Sa442 که اختصاصی استافیوکوکوس اورئوس و ژن mecA که اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین است، سویه‌ها تأیید هویت شدند. از بین ۱۵۰سویه استافیلوکوکی تعداد ۱۱سویه با روش دیسک دیفیوژن مقاوم به دیسک موپیروسین شناخته شدند و هیچ‌گونه هاله‌ای در اطراف دیسک موپیروسین دیده نشد. در روش E-test برای یک ایزوله MIC 8-256 µg/ml و برای ۱۰ سویه MIC≥512 µg/ml بود، بنابراین ۱۰سویه دارای مقاومت بالا و یک سویه دارای مقاومت پایین بود. از ۱۱ سویه مقاوم شناخته شده در روش فنوتیپی (دیسک دیفیوژن و E-test) در یک سویه که مقاومت پایین را در E-test نشان می‌داد، ژن ileS-1 شناسایی گردید (دارای باند DNA با وزن ملکولی bp ۶۹۰) و در ۴ سویه که مقاومت بالا را نشان می‌داد، mupA شناسایی گردید (دارای باند DNA با وزن ملکولی bp ۴۵۶) و در ۶ سویه که در E-test مقاومت بالا را نشان می‌داد، هر دو ژن mupA و ileS-1 وجود داشت و از بین ۱۱ سویه، ۵ سویه از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین MRSA و ۳ سویه از استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین MSS و ۳ سویه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی CONS مقاوم شناخته شدند.

بحث

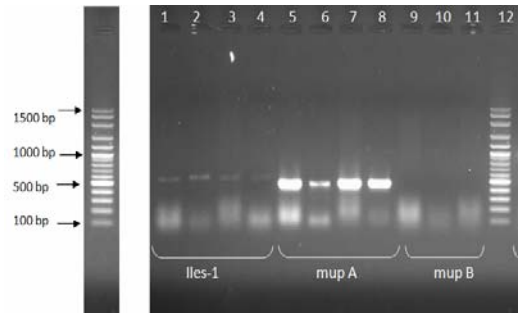
با توجه به این‌که بررسی‌های مختلف نشان داده است به کارگیری آنتی‌بیوتیک موپیروسین می‌تواند به

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه و طول قطعه حاصل بعد از واکنش PCR

ژن	پرایمر	توالی پرایمر (3 - 5)	سایز قطعه bp	منابع
Sa442	Sa442-Fb Sa442- Rb	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATAACAAC	۱۰۸	۳۶
mecA	mecA1 mecA2	TCCAGATTACAACTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	۱۶۲	۲۲
iles-1	lmr1 lmr2	GTA AAT CTT TAG GTA ATG TGATTG TAC TCT TCT TTA ACA TGT GGT GTATGA GA	۶۹۰	۳۴
mupA	mup1 Mup2	TAT ATT ATG CGA TGG AAG GTT GG AAT AAA ATC AGC TGG AAA GTG TTG	۴۵۶	۲۲
mupB	mupB-Fb mupB-Rb	CTAGAAGTCGATTTTGGAGTAG AGTGTCTAAAATGATAAGACGATC	۶۷۴	۱۸

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی سویه های استافیلوکوکی مقاوم به موپیروسین

سویه	iles-1	mupA	iles-1, mupA	mupB
MRSA	۰ سویه	۱ سویه	۴ سویه	۰سویه
MSSA	۱ سویه	۲ سویه	۰سویه	۰سویه
CONS	۰سویه	۱ سویه	۲سویه	۰سویه
مجموع	۱ ایزوله (٪۰/۶۶)	۴ ایزوله (٪۲/۶۶)	۶ ایزوله (٪۴)	۰ایزوله



تصویر شماره ۱: ژل آگارز محصولات ۳PCR سویه مورد آزمایش که هر ۳ سویه برای هردو ژن *mupA* و *ileS-1* مثبت بودند

طور قابل توجه رویداد عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوک‌ها راکاهش دهد و گسترش مقاومت می‌تواند مصرف این آنتی بیوتیک را بی فایده سازد و هزینه وطول درمان را بالا ببرد، بر آن شدیم تا میزان مقاومت به موپیروسین در بیمارستان‌های شهر اراک را مورد بررسی قرار دهیم.

مطالعات متعددی در ارتباط با مقاومت به موپیروسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین MSSA، مقاوم به متی سیلین MRSA و هم‌چنین استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی در سراسر دنیا و از جمله ایران انجام شده است. با توجه به در دسترس بودن موپیروسین از سال ۱۹۸۶، افزایش ثابت در میزان مقاومت به موپیروسین از سال ۱۹۹۰ به بعد مشاهده شده است(۳۰).

از ۱۱ سویه مقاوم شناخته شده در روش فنوتیپی (دیسک دیفیوژن و E-test) در مطالعه حاضر، در یک سویه با مقاومت پایین در E-test، ژن *ileS-1* شناسایی گردید. برخلاف مطالعه Jacob و همکارانش(۳۱) که در مطالعه خود سویه‌ها مقاوم به موپیروسین را با روش‌های فنوتیپی MIC و ژنوتیپی Real time PCR مورد بررسی قرار دادند، هیچ سویه با مقاومت پایین را نیافتند و این نشان دهنده عدم ایجاد جهش کروموزومی در سویه‌های مورد مطالعه آنان است. در مطالعه ما ۴ سویه که مقاومت بالا را نشان می‌داد، ژن mupA شناسایی گردید و این نشان دهنده حضور پلاسمید حاوی ژن mupA دراین سویه‌های مقاوم است.

در مطالعه Yun (۱۷) نیز که از روش میکرودایلوشن آگار برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، PCR برای ژن mupA و در نهایت سکونسینگ سویه‌ها برای شناسایی مقاومت به موپیروسین استفاده کردند، ژن mupA شناسایی شد. بر خلاف مطالعه Seah و همکارانش(۱۸) هیچ سویه‌ای با مقاومت بسیار بالا که ژن پلاسمیدی mupB را کد کند، در مطالعه ما مشاهده نشد و درمطالعه حاضر در ۶ سویه که در E-test مقاومت بالا را نشا ن می‌داد، ژن mupA و ileS-1 وجود داشت. در مطالعه ما و صادری در بین سویه‌های مقاوم، سویه‌های دارای مقاومت بالا نسبت به سویه‌های دارای مقاومت پایین درصد بالاتری به خود اختصاص دادند(۲۲)، ولی در مطالعه Fitzroy در سال ۲۰۰۸ مقاومت سطح پایین تر سهم بیش‌تری به خود اختصاص داده بود و این به دلیل ایجاد جهش کروموزمی بالاتر در ژن iles-1 در مطالعات آن‌ها است(۳۲).

همانند مطالعه ما که سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی مورد بررسی قرار دادیم، در سال ۲۰۱۳، Jayakumar و همکارانش نیز این سه گروه از سویه‌ها را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از مجموع ۱۵۰ سویه، ۳/۳ درصد از سویه‌ها مقاوم به موپیروسین شناخته شدند. شیوع این مقاومت نسبت به مطالعه ما کم‌تر بود چون درصد مقاومت در ۱۵۰ سویه

مورد مطالعه ما ۷/۳ درصد گزارش شد(۳۰) ولی در اکثر مطالعات فقط یک یا دوگروه از این سویه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت(۳۴).

در مطالعه ما بالاترین سطح مقاومت مربوط به سویه‌های MRSA بود که مشابه مطالعه Desroches و همکارانش بود. آن‌ها مقاومت به موپیروسین را از روش‌های میکرودایلوشن، PCR ، PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) و میکرواری شناسایی کردند(۱۹). ولی در مطالعه Chase در سال ۲۰۱۱ که به بررسی مقاومت به موپیروسین از طریق روش‌های E-test وهیبریداسیون دات بلات و PFEG و سکونسینگ ژن mupA و iles-1 پرداختند، برخلاف مطالعه ما و سایرین مقاومت به موپیروسین در سویه‌های MSSA بیش‌تر از سویه های MRSA بوده است(۳۵).

در مطالعه صادری در سال۲۰۰۹ که به منظور تعیین مقاومت نسبت به سویه های موپیروسین از روش‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن وE-test و در بررسی ملکولی تنها ژن mup A به منظور شناسایی مقاومت مورد بررسی قرار گرفت، تنها ۵ درصد از سویه ها مقاوم شناخته شد که مقاوم به متی سیلین نیز بودند. همانند مطالعه ما که تنها ۷/۳ درصد از سویه‌ها مقاوم به موپیروسین شناخته شدند و این می‌تواند به دلیل کاربرد محدوداین آنتی‌بیوتیک علی‌غم در دسترس بودن آن باشد(۲۲) ولی در مطالعه مهاجری که در سال ۲۰۱۲ بر روی سویه‌ها استافیلوکوکی برای شناسایی مقاومت به موپیروسین انجام شد، هیچ نوع مقاومتی به موپیروسین شناسایی نشده است و این آنتی بیوتیک به دلیل عدم وجود مقاومت در شهر کرمانشاه همانند شهر اراک قابلیت استفاده دارد(۲۴).

با توجه به مطالعه ما و سایرین می‌توان به این مطلب رسید که عواملی می‌تواند روی میزان شیوع استافیلوکوکوس‌های مقاوم به موپیروسین در کشورهای مختلف از جمله ایران مؤثر باشد، این موارد شامل سیاست‌های مختلف در اجرای برنامه کنترل عفونت، میزان وچگونگی تجویز آنتی‌بیوتیک، جمعیت، نوع یا تایپ سویه غالب و در نهایت به نوع متدولوژی آزمایشگاهی جهت تشخیص استافیلوکوک‌های مقاوم به موپیروسین بستگی دارد و با توجه به افزایش مقاومت به موپیروسین در ناحیه مرکزی ایران به خصوص با در نظر گرفتن به مطالعه‌ای که در شهر تهران توسط صادری و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد، مقاومت به موپیروسین از ۵ درصد به ۷/۳ درصد در مطالعه ما در سال ۲۰۱۳ رسیده است و این افزایش می‌تواند ناشی از مصرف ناصحیح وخود سرانه و عدم انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در جهت درمان بیماران باشد.

به طور خلاصه با توجه به نقش مؤثر آنتی‌بیوتیک موپیروسین بر اغلب کوکوس‌های گرم مثبت این آنتی‌بیوتیک از اهمیت به‌سزایی در درمان بیماران و ناقلین برخوردار است. لذا بررسی مقاومت در آن‌ها می‌تواند راه مؤثری جهت انتخاب درمان مناسب در این گونه عفونت‌ها باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران بخش میکروبی و ملکولی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی ایران شعبه مرکزی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر به عمل می‌آید. هم‌چنین از زحمات سرکار خانم مرضیه رنجبران که در شناسایی سویه‌های باکتریایی با ما همکاری داشته اند قدردانی می گردد.

References

1. Murray PR, Rosenthal KS and Pfaller MA. Medical Microbiology. J Philadelphia Elsevier 2005; 1(1): 221-236.
2. Stoodley P, Kathju S. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. J Clin Orthop Relat Res 2005; 437(2): 31-40.

3. Silva EC, Antas MG, Monteiro B, Neto A. Prevalence and risk factors for Staphylococcus aureus in health care workers at a university hospital of recife-PE Braz. J Infect Dis 2008; 12(6): 504-508.
4. Vinodhkumaradithyaa A, Uma A, Srinivasan M. Nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among surgical unit staff. Jpn J Infect Dis 2009; 62(3): 228.
5. De Carvalho MJ, Pimenta F, Hayashida M. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin susceptible S. aureus in the saliva of health professionals. J Clinics (Sao Paulo) 2009; 64(4): 295-293.
6. Aminzadeh Z, Mastari Farahani A, Gachkar L. Prevalence of Staphylococcus aureus in chronic hemodialysis patients admitted to hospital hemodialysis Labafinejad in 2000 and determine the antimicrobial resistance patterns. Iran Infectious and Tropical Diseases 2003; 9(25): 71-73.
7. Shehab SA, Shafey SI, Hadidy M, Bahaa A. Methicillin resistant staphylococcus aureus a problem in the burns unit Egypt. J Plast Reconstr Surg 2003; 27(1): 1-10.
8. Zamani A, Sadeghian S, Mosleh M. Prevalence of methicillin-resistance gene (*mec-A*) in different strains of Staphylococcus aureus PCR method for determining the antibiotic susceptibility Scientific. J Hamadan Univ Med Sci 2008; 14(3): 54-58 (Persian).
9. Lowy FD. Antimicrobial resistance the example of staphylococcus aureus. J Clin Invest 2003; 111(9): 1265-1273.
10. Enright MC. The evolutionary history of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J PNAS 2002; 99(11): 7687-7692.
11. Hallin M, Maes N, Byl B, Jacobs F, DeGheldre Y, Struelens MJ. Clinical Impact of a PCR Assay for Identification of Staphylococcus aureus and Determination of Methi-cillin Resistance Directly from Blood Cultures. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3942-3944.
12. von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Coagulase-negative staphylococci: pathogens have major role in nosocomial infections. J Postgrad Med 2001; 110(4): 63-76.
13. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. J Vet Microbiol 2009; 134(1-2): 45-54.
14. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W, Belkum A. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. J Lancet Infect Dis 2005; 5(12): 751-762.
15. Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother 1998; 41(1): 11-18.
16. Hodgson JE, Curnock SP, Dyke KG, Morris RofSylvester DR, Gross MS. Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance inStaphylococcus aureus. J Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(5): 1205-1208.
17. Yun HJ. Prevalence and mechanisms of low- and highlevel mupirocin resistance in staphylococci isolated from a Korean hospital. J Antimicrob Chemother 2003; 51(3): 619-623.
18. Seah C, Louie L, Simor A, Donald E, Roberto G. MupB, a New High-Level Mupirocin. Resistance Mechanism in Staphylococcus aureus. J Antimicrob Agents Chemotherapy 2012; 56(4): 1916-1920.
19. Prevalence of mupirocin resistance among invasive coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in France: emergence of a

mupirocin-resistant MRSA clone harbouring mupA. J Antimicrob Chemother 2013; 68(8): 1714-1717.

20. Schmitz FJ, Lindenlauf E, Hofmann B, Fluitb AC, Verhoef J. The prevalence of low and high mupirocin resistance in staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother 1998; 42(4): 489-495.
21. Wiese-Posselt M, Heuck D, Draeger A, Mielke M, Witte W, Ammon A. Successful terminationof a furunculosis outbreak due tolukS-lukF-positive, methicillin- susceptible Staphylococcus aureus in a German village by stringent decolonization 2002–2005. Clin Infect Dis 2007; 44(11): 88-95.
22. Saderi H, Olia P, Habibi M. Detection of mupirocin resistance in Staphylococcus aureus strains isolated from patients in four hospitals in Tehran University. J Medical Daneshvar 2009; 78(1): 31-38 (Persian).
23. Mohajeri P, Gholamine B, Rezae M. Frequency of Mupirocin Resistant Staphylococcus aureusStrains Isolated From Nasal Carriers in Hospital Patients in Kermanshah. Jundishapur J Microbiol 2012; 5(4): 560-563 (Persian).
24. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 4947-4955.
25. Perez-Roth E, Claveria-Martin F, Villar J, Méndez-Álvarez1 S. Multiplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcous aureus and detection of methicillin and mupirocin resistance. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4037-4041.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard M2-A7, 2005. 11th ed.
27. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. J Antimicrob Agent Chemother 1997; 41(5): 1137-1139.
28. Francis M, Francois J, Paul H, Roy M. Species-specific and ubiquitous-DNA based assays for Rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1998; 36(3): 618-623.
29. Sambrook J, Russell DW. Standard Ethanol Precipitation of DNA in Microcentrifuge Tubes. Cold Spring Harb. Protoc 2006; doi:10.1101/pdb.prot3813.
30. Upton A, Lang S, Heffernan H. Mupirocin and Staphylococcus aureus a recent paradigm of emerging antibiotic Resistance. J Antimicrob Chemother 2003; 51(3): 613-617.
31. Jacob S. Mupirocin Resistance Related to Increasing Mupirocin Use in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Pediatric Population. J Clinical Microbiology 2010; 48(7): 2599-2600.
32. Fitzroy A. The Emergence of Mupirocin Resistance among Clinical Isolates of Methicillin Resistance Staphylococcus aureus in Trinidad: a First Report. J Infect dis 2008; 61(2): 107-110.
33. Lee AS, Macedo-Vinas M, Francxois P, Renzi G, Schrenzel J, Vernaz N. Impact of Combined Low-Level Mupirocin and Genotypic Chlorhexidine Resistance on Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage After Decolonization Therapy: A Case control Study. J Clin Infect Dis 2011; 52(15): 1422-1430.

34. Braoios A, Fluminhan Júnior A, Pizzolitto AC. Multiplex PCR use for Staphylococcus aureus identification and oxacillin and mupirocin resistance evaluation. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2009; 30(3): 303-307.

35. Chase McNeil J, Kristina G. Mupirocin Resistance in Staphylococcus aureus Causing Recurrent Skin and Soft Tissue Infections in Children. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(5): 2431.