

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

قریان بهزادیان نژاد^۱ (Ph.D)، مucchomde 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 پژوهش های زیادی درباره فراوانی مقاومت و منشأ احتمالی آن انجام گرفته است. هدف این تحقیق، بررسی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت به ۱۲ آنتی بیوتیک انتخابی با روش دیسک دیفیوژن و تعیین منشأ احتمالی آنها با حذف پلاسمید به روش مجاورت با میتومایسین C است.

مواد و روش ها: سویه های مورد آزمایش از نمونه های بالینی بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی (ره) جدا شدند و در آزمایشگاه نگهداری شدند. بعد از کشت در محیط های آگار مغذی و آگار خون دار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد، گرمانه گذاری شدند و از پرگنه ها گستره تهیه، با روش گرم رنگ آمیزی و آزمایش های افتراقی کوآگولاز و تخمیر مانیتول DNAase انجام شد. بعد از تهیه سوسپانسیون تلفیقی، آزمایش های دیسک دیفیوژن (۱۲ نوع آنتی بیوتیک) انجام شد. همچنین با قرار دادن سویه ها در مجاورت میتومایسین C، سویه های حساس و مقاوم تعیین شد.

یافته ها: تایج نشان داد که به ترتیب بیشترین فراوانی به اریترومایسین (۵/۶۹)، آمپیسیلین (۴/۶۴)، نیتروفوراتنون (۵/۵۶)، ... وانکومایسین (۵/۳۱) بود و با مجاورت دادن سویه ها به میتومایسین C سبب کاهش قابل ملاحظه در فراوانی مقاومت های تک، دو گانه و چند گانه شد.

نتیجه گیری: یافته های فوق نشان می دهد که استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت لست به تعدادی آنتی بیوتیک های انتخابی درمان عفونت ها مقاومت با فراوانی متفاوت دارد و پلاسمیدها نه تنها در مقاومت به یک عامل بلکه در مقاومت های چند گانه نقش بسیار بارزی دارند.

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

مقدمه

جدا شده بالینی این باکتری مقاومت وجود دارد و مکانیسم های مختلفی چون انواع جهش های (ماکرولزیون و میکرولزیون) کروموزومی و کسب عناصر خارج کروموزومی (ترانسپوزون ها، ایتیگرین، پلاسمید) مسئول این مقاومت می باشند [۱۰، ۱۱، ۱۲]. پلاسمیدها قدرت جابجایی بسیار زیادی داشته و با توجه به آنکه

استافیلوکوک ها از سازش پذیرترین و موذی ترین ارگانیسم های طبیعت اند، از این رو در همه جا وجود دارند و عفونت های گوناگونی ایجاد می کنند [۲]. این باکتری در عفونت های بیمارستانی نقش بسیاری دارد و شیوع آن نیز رو به افزایاد است [۱۵]. در بین سویه های

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

کلیندامايسين و کوتريموكسازول (ساخت کارخانه
شرکت پادتن طب) استفاده گردید.

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

حذف پلاسمیدها با میتومایسین C. بعد از تهیه سوپیانسیون دارای استاندارد، میتومایسین C با غلظت ۱۰ ppm به آن اضافه و سوپیانسیون ۴۸ ساعت در RPM ۱۵۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد گرمانه گذاری گردید [۱۵] و سپس سوپیانسیون به محیط مولرهینتون آگار برای انجام آزمایش دیسک دیفیوژن، مشابه مرحله قبل اضافه شد [۱۶].

نتائج

از ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده، درصد زیادی به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه مقاوم بودند که به ترتیب بیشترین فراواتی به اریترومایسین (۶۹/۵ درصد)، آمپی سیلین (۶۴ درصد)، تتراسیکلین

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

سویه‌های مقاوم		آنتی‌بیوتیک
درصد	تعداد	
۷۱/۷۸	۹۲	آمپی سیلین
۹۴/۹۳	۷۵	سفالوتین
۹۲/۲۹	۱۰۴	کلرامفنتیکل
۸۱/۲۹	۱۱۳	اریتروماسیسین
۹۱/۱۷	۹۳	جنتاماسیسین
۸۶/۴۵	۸۳	پنی سیلین G
۶۲/۵	۷۵	تراسیکلین
۲۶/۸۷	۴۵	کوئریموکسازول
۶۱/۱۸	۵۲	کلینداماسیسین
۷/۹۴	۵	وانکوماسیسین
۱۷/۷۰	۲۰	نیتروفورانتوئین
۲۲/۹۴	۲۵	ریفارامپین

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 رُن‌های خفته مقاومت در پلاسمیدها می‌شوند [۷].

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که پلاسمیدهای کونزروگاتیو و غیر کونزروگاتیو در استافیلوکوکوس اورتیوس وجود دارد که مقاومت به آنتی بیوتیک‌های گوناگونی را به تنها بی و یا مقاومت‌های چندگانه را رمز می‌کنند [۶]. از این رو، با توجه به چنین اهمیتی هدف این مطالعه مشخص کردن الگوی آنتی بیوتیکی 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 مانیبول DNAase انجام شد. جهت کنترل کیفی آزمایش‌ها از سویه ATCC 6832P Staphylococcus aureus (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) استفاده شد [۱].

آزمایش‌های دیسک دیفیوژن. بدین منظور از دیسک‌های ۱۲ آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، کلرامفنیکل، اریسترومایسین، پتنتی‌سیلین G، سفالوئین ریفامپین، نیتروفوراتوئین، آمپی‌سیلین، تراسیکلین و

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

درصد تغییرات	بعد از افزودن میتومایسین C		قبل از افزودن میتومایسین C		نوع مقاومت داروئی
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۸۹/۴۷	۱۵/۲	۱۷	۹/۵	۱۹	پنی سیلین + وانکومایسین
۸۰/۸۵	۱۹	۳۸	۲۳/۵	۴۷	تراسیکلین + نیتروفورانتوئین
۹۷/۲۲	۱۷/۵	۳۵	۱۸	۳۶	سفالوتین + ریفامپین
۱۰۰	۹	۲۸	۱۹	۳۸	جنتامایسین + کلرامفینیکل
۸۶/۹۵	۱۰	۲۰	۱۱/۵	۲۳	اریترومایسین + کلیندامایسین
۹۴/۱۱	۸	۱۶	۸/۵	۱۷	ریفامپین + وانکومایسین
۱۰۰	۲۶/۵	۵۳	۲۶/۵	۵۳	آمپی سیلین + اریترومایسین
۱۰۰	۴	۸	۴	۸	سفالوتین + وانکومایسین

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

درصد تغییرات	بعد از افزودن میتومایسین C		قبل از افزودن میتومایسین C		نوع مقاومت داروئی
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۴	۸	۴	۸	ریفامپین + سفالوتین + پنی سیلین
۱۰۰	۸	۱۷	۸/۵	۱۷	آمپی سیلین + اریترومایسین + تراسیکلین
۵۰	۱/۵	۳	۳	۶	وانکومایسین + نیتروفورانتوئین + ریفامپین

می‌دهد. همان‌گونه که در جداول مشخص شد پس از افزودن میتومایسین C مقاومت (به یک آنتی بیوتیک، دوگانه و چندگانه) به میزان بسیار زیادی کاهش یافت و حتی به صفر رسید.

(۶۰ درصد)، نیتروفورانتوئین (۵۶/۵ درصد)، ریفامپین (۵۴/۵ درصد)، کلرامفینیکل (۵۴ درصد)، جنتامایسین (۵۱ درصد)، کوتیریموکسازول (۴۸ درصد)، پنی سیلین (۴۷/۵ درصد)، کلیندامایسین (۴۲/۵ درصد)، سفالوتین (۳۹/۵ درصد) و وانکومایسین (۳۱/۵ درصد) اختصاص داشت.

بحث

۱- نتایج این تحقیق نشان می‌دهد استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به تعدادی از آنتی بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها از جمله آمپی سیلین، اریترومایسین، سفالوتین، کلرامفینیکل، تراسیکلین، وانکومایسین و ... مقاومت دارد، لیکن فراوانی مقاومت در بین آنها بسیار متفاوت است [۲، ۱۶].

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

از بین آنتی بیوتیک‌ها، سفالوتین با حدود ۹۵ کلرامفینیکل (۹۲/۲۹)، جنتامایسین (۹۱/۱۷) و پنی سیلین (۸۶/۴۵)، بیشترین مقاومت با منشاً پلاسمیدی و وانکومایسین، نیتروفورانتوئین، ریفامپین و کوتیریموکسازول کمترین مقاومت با منشاً پلاسمیدی را داشتند (جدول ۱).

جدول ۲ و ۳ فراوانی مطلق و نسبی سویه‌های مقاوم و مقاومت‌های دوگانه آنتی بیوتیکی در آزمایش‌های دیسک دیفیوژن، قبل و پس از افزودن میتومایسین C در میان ۲۰۰ سویه جدا شده از نمونه‌های بالینی را نشان

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 حائز اهمیت‌اند و باید در درمان عفونت‌های ناشی از آن به این مهم توجه باشیم 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 ۲۶-۳۲.
- [۳] شاهچراغی، ف. بررسی رابطه بین عفونت‌های زخمی و آلوگی اتاق عمل و مطالعه فاکتور مقاومت در باکتری‌های جدا شده، دانشگاه تربیت مدرس، پایان‌نامه، ۱۳۷۵، ص ۶۳-۶۱.
- [۴] Antonec, A. M., β -lactamases, Br. Med. Bull., 40 (1984) 18-27.
- [۵] Bernard, W.B., Inducible erythromycin resistance in bacteria, Br. Med. Bull., 40 (1984) 47-53.
- [۶] Coben, M.L., Wong, E.F. and Comon, R., Plasmid in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* during nosocomial *Staphylococcus aureus* outbreak, Antimicrob. Agent Chemother., 21 (1984) 210-215
- [۷] Elsoth, N., Fouacc, J.M., Pillert, J. and Chalbert, Y.A., Plasmid DNA content of

- 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 مovid 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]، کلرامفینیکل [۸]، ... به اثبات رسیده است ولی سهمی که در هر گروه آنتی‌بیوتیکی دارد، بسیار متفاوت است.

در این تحقیق نیز به وضوح نقش احتمالی پلاسمید در مقاومت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک بررسی شده، نمایان و مدلل شد. علاوه بر آن نتایج بدست آمده مovid 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 جستامايسین و کلرامفینیکل، آمپی‌سیلین و اریترومايسین و نیز وانکومايسین و سفالوتین وجود داشت، پس از افزودن میتومايسین 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

- [13] Lampson, B.C., Von David, W. and Parisi, J.T., Novel mechanism plasmid mediated erythromycin resistance by p NE24 from *staphylococcus 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-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicccillin- 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 *Staphylococcus 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.
- 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 *Staphylococcus 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 *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 317(1987) 1039-1045.
- [11] Sunders, J.R., Genetic and evolution of antibiotic Resistance, *Br. Med.I 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 infectious diseases, Churchill living stone, Landon, 1995, pp. 212-221.

Antibiotic resistance patterns and plasmid profiles of 200 clinically isolated *Staphylococcus 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°C. Gram staining, coagulase and DNAase monitol fermentation tests were done. After preparing inoculating suspension, 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 erythromycin (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 resistance to a antibiotic but also play obvious role in multiple resistance.

Key words: Plasmid; Mitomycin C; *Staphylococcus aureus*; Resistance; Antibiotic

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