Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains according to the Multiplex-PCR and study of phenotypic drug resistance

Rasoul Mirzaei[1], Malihe Talebi[1], Faeze Mahdiun[2], Mohammad Foroozeshfard[3], Gholamreza Irajian[1]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Department of Anesthesia, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/09/22
Accepted: 2016/05/04
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 10(6): 09-15

Corresponding author at:

Dr. Gholam Reza Irajian

Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982188058649

Email:
dr.irajian@gmail.com

Abstract

Background and Aim: With increase *Staphylococcus epidermidis* infections, discrimination between invasive and non-invasive *S. epidermidis* strains and determination of drug resistance, for diagnosis and treatment is important.

Materials and Methods: From August 2014 to March 2015**,** 123 strains isolated from patients and medical instruments from Ali Asghar and Hazrat Rasoul hospitals were used to discriminate invasive and contaminating *S. epidermidis* strains by *ica, atlE, agrA, sarA,* and *mecA* genes by Multiplex PCR method**.** Also, according to the CLSI standards, resistance to cefoxitin, linzeolid, clindamycin, erythromycin and tetracycline were tested by disk diffusion method and vancomycin E-test method.

Results: prevalence of *ica* and *mecA* genes were 85% and 75% in invasive strains and 20% and 51% in contaminating strains, respectively. The resistance level to cefoxitin, tetracycline, clindamycin and erythromycin antibiotics in invasive strains were: 75%, 35%, 37%, 76% and in contaminating strains were; 51%, 40%, 30%, 64%, respectively. Resistance to vancomycin and linezolid was not observed in this study.

Conclusions: This study shown that *ica* gene can be used as a suitable marker for discrimination between invasive and contaminating isolates. Also, vancomycin is a better choice for the treatment of resistant patients to methicillin.

KeyWords: Invasive *Staphylococcus epidermidis*, Methicillin, Disk diffusion, Multiplex PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mirzaei R, Talebi M, Mahdiun F, Foroozeshfard M, Irajian G. Discrimination between Invasive and Contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains according to the multiplex-PCR and study of phenotypic drug resistance. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 09-15

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

تمایز بین سویه‌های مهاجم و آلوده‌کننده *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بر اساس Multiplex- PCR و بررسی فنوتیپی مقاومت دارویی

رسول میرزایی[۱]، ملیحه طالبی[۱]، فائزه مهدیون[۲]، محمد فروزش فرد[۳]، غلامرضا ایراجیان[۱]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳. گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۳۱
پذیرش:۱۳۹۵/۰۲/۱۵
انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶
موضوع:
باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(6): 09-15

نویسنده مسئول:
دکتر غلامرضا ایراجیان

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۸۸۰۵۸۶۴۹

پست الکترونیک:
dr.irajian@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: با افزایش عفونت‌های ایجادشده توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، افتراق بین سویه‌های مهاجم و غیر مهاجم و تعیین الگوی مقاومت میکروبی در این سویه‌ها، ازنظر تشخیص و درمان، دارای اهمیت می‌باشد.

مواد و روش کار: از شهریور ۹۳ تا فروردین ۹۴، تعداد ۱۲۳ سویه جداشده از بیماران و تجهیزات پزشک از بیمارستان های حضرت رسول (ص) و حضرت علی اصغر(ع) با استفاده از ژن‌های *ica*، *atlE*، *agrA*، *sarA* و *mecA* به روش Multiplex- PCR جهت تمایز سویه‌های مهاجم و آلوده‌کننده استفاده شد. همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، لینزولاید، کلیندامایسین، اریترومایسین و تتراسایکلین به روش انتشار در آگار و ونکومایسین به روش E-test، بر اساس استانداردهای (CLSI) بررسی شد.

یافته‌ها: شیوع ژن‌های *ica* و *mecA* به ترتیب در سویه‌های مهاجم ۸۵٪ و ۷۵٪ و در سویه‌های غیر مهاجم ۲۰٪ و ۵۱٪ بود ($P<0.05$). میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، تتراسایکلین، کلیندامایسین و اریترومایسین به ترتیب در سویه‌های مهاجم: ۷۵٪، ۳۵٪، ۳۷٪، ۷۶٪ و در سویه‌های آلوده‌کننده: ۵۱٪، ۴۰٪، ۳۰٪، ۶۴٪ بود. در این مطالعه هیچ‌گونه مقاومتی نسبت به وانکومایسن و لینزولاید مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *ica* می‌تواند به‌عنوان مارکر مناسبی برای تمایز سویه‌های مهاجم از سویه‌های آلوده‌کننده مطرح باشد. همچنین جهت درمان بیماران مقاوم به متی سیلین، ونکومایسین داروی مناسبی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مهاجم، متی سیلین، دیسک دیفیوژن، Multiplex-PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس باکتری کواگولاز منفی است که به‌طور اولیه فلور نرمال پوست می‌باشد و به‌طور ویژه با گسترش استفاده از وسایل پزشکی تعبیه شونده در بدن، به‌عنوان بیماری‌زای بیمارستانی غالب ظهور کرده است (۱). ورود مقدار کمی باکتری از پوست یا غشاهای مخاطی بیمار یا کارکنان درمانی هنگام کاتترگذاری، استفاده از پروتز یا بازبینی‌های بعدی می‌تواند در ایجاد عفونت نقش تعیین‌کننده‌ای داشته باشد (۲). این باکتری همچنین از عفونت‌هایی نظیر زخم، خون، مجاری ادراری، اندوکاردیت، باکتریمی، پنومونی، پوست و بافت نرم جداشده است (۳). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در بیمارانی که سیستم ایمنی‌شان سرکوب‌شده و یا به مدت طولانی در بیمارستان بستری می‌شوند بیماری‌زایی بیشتری دارد (۴). همچنین این باکتری شایع‌ترین استافیلوکوکوس کواگولاز منفی عامل عفونت خون در بیمارستان می‌باشد (۵). این ارگانیسم به‌طور مکرر آلوده‌کننده کشت‌های خون می‌باشد که مشکل مهمی برای آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌باشد. *استافیلوکوکوس*

اپیدرمیدیس به‌واسطه اتصال به سطوح باعث ایجاد بیماری می‌شود (۶). ترکیب اصلی بیوفیلم این باکتری، پلی ساکارید سلولی است که باعث محافظت باکتری از سیستم ایمنی و کلونیزاسیون باکتری در سطوح وسایل پزشکی مثل کاتترهای داخل وریدی و شانت های مفصلی می‌شود (۷). اخیراً ثابت‌شده که اتصال اولیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به سطوح، توسط ژن کروموزومی *atlE* کد می‌شود که شباهت زیاد به اتولیزین *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۸). هم‌چنین ژن *ica* باعث تجمع و توده‌ای شدن بیشتر بیوفیلم می‌شود (۹). علاوه بر فاکتورهای بیماری‌زایی که در اتصال و تولید بیوفیلم نقش دارند، ژن‌های *sar* و *agr* برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شناسایی‌شده است که ممکن است در تنظیم بیان ژن کروموزومی *mecA* که مسئول مقاومت به متی سیلین است، نقش داشته باشند (۱۰). اخیراً مطرح‌شده است که در سویه‌های مهاجم (جداشده از خون، ادرار، زخم، کاتتر و پروتز) یعنی سویه‌هایی که چندین بار متوالی از کشت جدا می‌شوند و بر اساس مطابقت با شرح‌حال بیمار و تاریخچه، به‌عنوان عامل بیماری شناخته می‌شوند، ژن *ica* تقریباً همیشه به‌طور منحصربه‌فرد حضور دارد و در ایزوله‌های ساپروفیت و فلور (غیر بالینی) یعنی سویه‌هایی که عامل بیماری نبوده‌اند، کمتر قابل‌شناسایی است (۱۱). بنابراین یکی از اهداف این مطالعه پاسخ به این سؤال است: آیا حضور ژن‌های *sar*، *agr*، *atlE*، *ica* و *mecA* می‌تواند بین سویه‌های بیماری‌زای (مهاجم) و ساپروفیت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که آلوده‌کننده محیط کشت می‌باشند تمایز بگذارد؟ لذا جهت بررسی ژن‌های مذکور در این سویه‌ها از روش Multiplex-PCR استفاده شد. مدت کوتاهی پس از کاربرد متی سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های نیمه صناعی مانند اگزاسیلین در سال ۱۹۶۱ اولین مورد مقاومت به متی‌سیلین در *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد، اما طی مطالعاتی که در دهه ۱۹۷۰ صورت گرفت، مشخص شد که مقاومت به متی‌سیلین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (SE) شیوع بیشتری دارد (۱۴-۱۲). ژن *mecA* که کد کننده PBP2a (Penicillin binding protein2a) می باشدکه تمایل کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد، سبب مقاومت به متی‌سیلین می‌شود (۱۵). با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به متی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها، تعیین الگوی مقاومت دارویی این باکتری مهم می‌باشد. بنابراین علاوه بر تمایز سویه‌های مهاجم و آلوده‌کننده *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به روش Multiplex-PCR، هدف دیگر این مطالعه تعیین الگوی مقاومت دارویی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به روش فنوتیپی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در فاصله زمانی شهریور ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴، تعداد ۱۲۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شامل ۶۳ ایزوله جداشده از نمونه‌های کلینیکی بیماران و ۱۲ ایزوله از محیط بیمارستان و ۴۸ ایزوله از بیماران سرپایی، از آزمایشگاه‌های بیمارستان حضرت رسول (ص) (۵۳ ایزوله) و بیمارستان علی‌اصغر (ع) (۷۰ ایزوله) جمع‌آوری شد که محدوده سنی بیماران ۶ ماه تا ۵۰ سال بود. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، کواگولاز، مقاومت به پلی‌میکسین B، حساسیت به نوبیوسین و تخمیر مانیتول)، ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تشخیص داده شدند. به‌منظور تأیید تشخیص این ایزوله‌ها از روش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (SE) استفاده شد.

تعیین سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین (MRSE) و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

با استفاده از دیسک سفوکسیتین (30µg) و به روش دیسک دیفیوژن، جهت شناسایی و جداسازی سویه‌هایی MRSE اقدام شد. اگر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک سفوکسیتین ≥ ۲۱mm باشد، مقاوم در نظر گرفته می‌شود (۱۶). جهت بررسی حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (۳۰µg)، کلیندامایسین (۲ µg)، لینزولاید و تتراسایکلین (µg ۳۰) تهیه‌شده از شرکت MAST، بر اساس دستورالعمل Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2011) (۱۷) و به روش کربی بائر در محیط مولر هینتون و تعیین MIC ونکومایسین به روش E-test اقدام شد. از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل استفاده شد (۱۸).

استخراج DNA باکتری‌ها

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت روش (Roche Company, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت صورت گرفت.

Multiplex- PCRجهت شناسایی ژن‌ها

پرایمر های استفاده‌شده در Multiplex-PCR، در جدول شماره ۱ ذکرشده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده‌شده در واکنش PCR (۱۹)

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمر موردنظر (′۳→′۵)	طول قطعه موردنظر(جفت باز)
atlE	F= 5′- CAACTGCTCAACCGAGAACA-3′ R=5′- TTTGTAGATGTTGTGCCCCA-3′	۶۸۲
ica	F=5′- TTATCAATGCCGCAGTTGTC-3′ R=5′- GTTTAACGCGAGTGCGCTAT-3′	۵۴۶
sarA	F= 5′-TGGTCACTTATGCTGACAGATT-3′ R= 5′-TTTGCTTCTGTGATACGGTTG-3′	۳۱۳
agr	F=5′- CAACAACGAAACATGGTGCT-3′ R=5′- TGTCATCGAAAATGGTTACTTTG-3′	۷۳۷
mecA	F=5′- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3′ R=5′- AGTTCTGGAGTACCGGATTTGC-3′	۵۱۳
SE (S. epidermidis)	F= 5′-GGAATTCAAA(T/G)GAATTGACGGGGGC-3′ R=5′-CGGGATCCCAGGCCCGGGAACGTTTCAC-3′	۱۲۳

مخلوط واکنش (PCR Mixture) شامل ۰/۵ µL از هر پرایمر، ۱۳ µL مسترمیکس (بیوساینس، انگلیس)، و ۲ µL DNA و ۴ µL آب دیونیزه که حجم نهایی برابر ۲۵ µL شد. تکثیر ژن در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Ependorf) ساخت کشور آلمان با استفاده از چرخه حرارتی، طبق جدول ۲ انجام شد. در واکنش‌های PCR از سویه استاندارد ATCC 43300 (*mecA, agr, atlE, sar* positive) و ATCC 35984 (*ica* positive) *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به‌عنوان کنترل مثبت و از مخلوط حاوی ۰/۵µL از هر پرایمر، ۱۳ µL مسترمیکس (بیوساینس، انگلیس)، و ۶ µL آب دیونیزه، با حجم نهایی برابر با ۲۵ µL، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس‌ازاین مرحله بافر TBE 5X(Tris Base 54.5gr، Boric Acid 27.8gr، EDTA 3.72 DDW1000 ml،gr) که با آب مقطر، ۱۰ برابر رقیق کرده تا بافر TBE 0.5X به دست آید. این بافر برای تهیه ژل آگارز و بافر تانک الکتروفورز استفاده شد. برای الکتروفورز محصول PCR از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. ۷µL از محصول PCR را داخل چاهک‌های ژل قرارگرفته شد. دریکی از چاهک‌ها ۳ µL مارکر (100-3000 bp) ریخته شد. الکتروفورز، با ولتاژ ۷۰ به مدت ۹۰ دقیقه انجام‌شده و سپس به‌منظور رنگ‌آمیزی، به مدت ۲۰ دقیقه داخل ظرف حاوی safety stain (0.5 µg/mL) قرار گرفت. ژل رنگ‌آمیزی شده را در دستگاه Gel documentation (بیو رد، آمریکا) قرار داده و از آن عکس تهیه شد.

جدول ۲: سیکل حرارتی استفاده‌شده برای PCR (۱۹)

زمان	دما	مرحله
۵ دقیقه	۹۵ درجه سلسیوس	واسرشته کننده اولیه
۲ دقیقه	۹۵ درجه سلسیوس	واسرشته کننده
۱ دقیقه	۵۸ درجه سلسیوس	اتصال
۱ دقیقه	۷۰ درجه سلسیوس	بسط و تکثیر
-----	۳۰	تعداد دور
۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سلسیوس	تکثیر نهایی
-----	۲۲ درجه سلسیوس	نگهدارنده

در این مطالعه اطلاعات بیماران کاملاً محرمانه بوده و در درمان بیماران هیچ‌گونه دخالتی صورت نگرفت. با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (کمبریج، آمریکا) و با در نظر گرفتن $p<0.05$، تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از آزمون کای اسکوئر انجام شد.

یافته‌ها

همه ۱۲۳ ایزوله جمع‌آوری‌شده به‌عنوان *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شناسایی و توسط PCR تأیید شدند.

آنتی بیوگرام

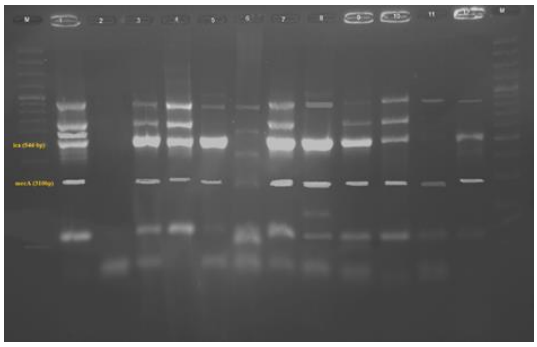
نتایج آنتی بیوگرام به‌منظور تعیین فراوانی سویه‌های مقاوم به متی سیلین (MRSE) و میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول ۳: میزان شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ایزوله‌های بالینی و غیر بالینی (ساپروفیت و فلور) *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

محل نمونه برداری	تعداد نمونه	متی سیلین	اریترومایسین	تتراسایکلین	کلیندامایسین	ونکومایسین	لاینزولید	P value
بالینی	۶۳	٪۷۵	٪۷۶	٪۴۰	٪۳۷	۰	۰	۰/۰۲
ساپروفیت (غیر بالینی)	۱۲	٪۴۷	٪۶۰	٪۳۱	٪۳۶	۰	۰	۰/۰۶۳
فلور (غیر بالینی)	۴۸	٪۵۲	٪۶۵	٪۳۶	٪۴۱	۰	۰	۰/۰۷۳

PCR جهت شناسایی ژن‌ها

آزمون Multiplex- PCR جهت بررسی وجود ژن‌های *sar*، *agr*، *atlE*، *ica* و *mecA* انجام شد. پس از پس از انجام PCR و رنگ‌آمیزی با safety stain، قطعه موردنظر ژن‌های *mecA* (۵۱۳ bp)، *ica* (۵۴۶ bp)، *atlE* (۶۸۰ bp)، *sar* (۳۱۳ bp) و agr (۷۲۳ bp) و *SE* (۱۲۳ bp) مشاهده گردید (شکل ۱). شیوع ژن‌های *ica* و *mecA* در سویه‌های مهاجم به ترتیب ۸۵٪ و ۷۵٪ و در سویه‌های غیر مهاجم ۲۰٪ و ۵۱٪ به دست. ژن‌های *sar* و *agr* به ترتیب در ۱۰۰٪ سویه‌های بالینی و غیر مهاجم و ژن *atlE* به ترتیب در ۹۵٪ و ۹۱٪ سویه‌های مهاجم و غیر مهاجم وجود داشت.



شکل ۱: تصویر محصول Multiplex-PCR. به ترتیب از چپ به راست، مار کر (M)، کنترل مثبت (۱)، کنترل منفی (۲)، نمونه‌های ران شده (۳ تا ۱۲)، مارکر (M)

بحث

پس‌ازآنکه در دهه‌های اخیر نقش *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به‌ویژه در عفونت‌های بیمارستانی ثابت شد، مطالعات مختلفی به‌منظور شناسایی ژن‌های بیماری‌زا در ایزوله‌های مختلف *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و تعیین مقاومت دارویی این باکتری صورت گرفته است. اطلاعات کمی در مورد سویه‌های مهاجم و محیطی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و همچنین شیوع مقاومت به متی‌سیلین (*methicillin resistant staphylococcus epidermidis (MRSE)*) در این باکتری در ایران وجود دارد. در مطالعه ما، ژن *atlE* در ۹۵٪ ایزوله‌های بالینی و در ۹۱٪ ایزوله‌های محیطی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* وجود داشت (p=.652). به‌طور مشابه در مطالعه Frebourg و همکاران، شیوع ژن *atlE* در ایزوله‌های بالینی ۹۶٪ و در ایزوله‌های ساپروفیت ۹۰٪ به دست آمد (۱۹) و در مطالعه Vandecasteele ژن *atlE* در ۸۸٪ ایزوله‌های بالینی و در ۸۶٪ ایزوله‌های محیطی وجود داشت که نزدیک به مطالعه حاضر می‌باشد (۲۰). ژن‌های *agr* و *sar* در ۱۰۰٪ ایزوله‌های بالینی و محیطی وجود داشت. در مقابل ژن *ica* در سویه‌های بیماری‌زا بیشتر از سویه‌های آلوده‌کننده یافت شد (۸۵٪ در مقابل ۲۰٪) (p=0.00) که این نتیجه نزدیک به مطالعه Ziebuhr و همکاران است (۱۱) که اعلام نمودند ژن *ica* در ۸۸٪ ایزوله‌های خون در برابر تنها ۶ درصد سویه‌های ساپروفیت وجود داشت و ژن‌های *agr* و *sar* در تمام ایزوله‌های بالینی و ساپروفیت وجود داشت، ولی در مطالعه Vandecasteele و همکاران فراوانی ژن *ica* در ایزوله‌های بالینی و غیر بالینی به ترتیب ۸۸٪ و ۳۸٪ گزارش‌شده است که کمتر از مطالعه حاضر می‌باشد (۲۰). این اختلافات جزئی در شیوع ژن‌ها در مطالعه حاضر با دیگر مطالعات می‌تواند به منشأهای مختلف ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مطالعات مختلف مرتبط باشد. هم‌چنین ژن *mecA* به میزان بیشتری در سویه‌های بیماری‌زا نسبت به سویه‌های آلوده‌کننده یافت شد (۷۵٪ در برابر ۵۱٪) (p=0.03) که نزدیک به نتایج به‌دست‌آمده توسط Frebourg و همکاران می‌باشد که فراوانی ژن *mecA* در ایزوله‌های غیر کلینیکی و بالینی به ترتیب ۵۰٪ و ۷۵٪ گزارش شد(۱۹). Rahimi و همکاران فراوانی ژن *mecA* را در ایزوله‌های بالینی ۷۰٪ به دست آوردند که مشابه نتیجه ما می‌باشد (۲۱). فراوانی ژن‌های *mecA*، *ica*، *atlE*، *agr* و *sar* به ترتیب در بیمارستان علی‌اصغر (ع) برابر ۶۴٪، ۵۸٪، ۹۲٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ و در بیمارستان حضرت رسول (ص) برابر ۶۰٪، ۴۷٪، ۹۲٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود که این اختلاف شیوع ژن‌ها در دو بیمارستان ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>0.05). گرچه شناسایی ژن‌های *ica* و *mecA*، حساسیت کافی جهت راهنمایی پزشکان به‌منظور تشخیص را ندارد، ولی می‌تواند مشخص‌کننده این موضوع باشد که سویه‌های دارای ژن‌های *ica* و *mecA* مقاومت بیشتری به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. یکی از اهداف این پژوهش، تعیین الگوی مقاومت دارویی به متی سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها بود، زیرا بنابر گزارش‌ها شیوع ژن *mecA* در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد و همچنین مقاومت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز در این باکتری مشاهده‌شده است (۱۸). بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها در این مطالعه نشان داد که سویه‌های جداشده از بیماران بستری در مقایسه با سویه‌های جداشده از بیماران سرپایی و فلور مقاومت بیشتری به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند.

در این مطالعه فراوانی MRSE در بین سویه‌های جداشده از نمونه‌های بالینی (شامل افراد بستری) ۷۵٪ و در بین سویه‌های جداشده از نمونه‌های فلور و محیطی ۵۱٪ بود که نشان‌دهنده شیوع بالای این سویه‌ها در بین بیماران می‌باشد. مطالعه Stefani نشان می‌دهد که شیوع MRSE در برخی مناطق اروپا ۷۰٪-۶۰٪ می‌باشد (۲۲). در سوئیس موسسه Sentinel Surveillance of Antibiotic Resistance in Switzerland (SEARCH) گزارش کرد که در سال ۲۰۰۸ میزان شیوع سویه‌های MRSE در بین بیماران سرپایی ۳۵٪ بوده است (۲۳). وانکومایسن نقش مهمی در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین دارد بااین‌وجود، استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی اولین ارگانیسم‌هایی بودند که به وانکومایسین مقاومت نشان دادند. خوشبختانه مقاومت به وانکومایسین در مطالعه ما مشاهده نشد. هم‌چنین، هیچ‌گونه مقاومتی نسبت به لینزولاید که یک عامل ضد میکروبی با طیف گسترده علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) و استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین (MR-CoNS) می‌باشد (۲۴)، یافت نشد. در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به تتراسایکلین که یک آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف مؤثر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد، در بین سویه‌های جداشده از بیماران سرپایی بالاتر از سویه‌های بیمارستانی بود (۴۰٪ به ۳۵٪) ($p>0.05$). این موضوع شاید به این دلیل باشد که چون تتراسیکلین به‌صورت پماد موضعی جهت درمان ضایعات پوستی شایع در دسترس افراد جامعه می‌باشد، باعث ایجاد مقاومت در فلور نرمال پوست نسبت به این آنتی‌بیوتیک شده است. کلیندامایسین از داروهای پرمصرف در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی استخوان، مفاصل و پریتونیت محسوب می‌شود، در این تحقیق مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در ۳۷٪ ایزوله‌های کلینیکی و در سویه‌های جداشده از محیط ۳۰٪ مشاهده گردید ($p>0.05$)، که در مقایسه با میزان گزارش‌شده از استرالیا (۳۲٪) و کشورهای جنوب شرقی آسیا (۳۱٪) بالاتر می‌باشد. اریترومایسین از داروهای ماکرولیدی می‌باشد که علیه بسیاری از باکتری‌ها شامل استافیلوکوک ها و استرپتوکوک ها مؤثر می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک به‌عنوان جایگزین پنی‌سیلین‌ها در بیمارانی که به این داروها حساسیت دارند مصرف می‌شود. مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در سویه‌های مهاجم ۷۶٪ به دست آمد که با مطالعات انجام‌شده قبلی نزدیک است. در مقابل، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در سویه‌های آلوده‌کننده، ۶۴٪ به دست آمد ($p=0.05$). پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های بعدی از تعداد نمونه‌های بیشتری استفاده شود و نتایج Multiplex-PCR را به‌منظور تمایز بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با بقیه روش‌های مولکولی جهت تمایز و تیپ بندی مقایسه شود. همچنین برای به‌منظور تعیین الگوی مقاومت دارویی از روش‌های ژنتیکی نیز استفاده شود و نتایج روش‌های فنوتیپی و ژنو تیپی با یکدیگر مقایسه شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری‌های صمیمانه کارکنان محترم بیمارستان‌های حضرت رسول اکرم (ص) و حضرت علی‌اصغر (ع) قدردانی می‌نماییم.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Sahal G, Bilkay IS. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Braz J Microbiol 2014;45(2):539-44.
2. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis 2002;2(11):677-85.
3. Gallo J, Kolar M, Novotny R, Rihakova P, Ticha V. Pathogenesis of prosthesis-related infection. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2003;147(1):27-35.
4. Ziebuhr W. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis: emerging pathogens in nosocomial infections. Contrib Microbial 2001;8:102-7.
5. Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K, Hill B, McAllister S, Nelson P, et al. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus epidermidis. Infect Control Hosp Epidemiol . 1999;20(3):167-70.
6. Barrau K, Boulamery A, Imbert G, Casalta JP, Habib G, Messana T, et al. Causative organisms of infective endocarditis according to host status. Clin Microbiol Infect 2004;10(4):302-8.

7. Dickinson TM, Archer GL. Phenotypic expression of oxacillin resistance in Staphylococcus epidermidis: roles of mecA transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection. Antimicrob Agents Chemother . 2000; 44(6):1616-23.
8. Hebert GA. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype Staphylococcus lugdunensis and Staphylococcus schleiferi. J Clin Microbial 1990; 28(11):2425-31.
9. Solis N, Cain JA, Cordwell SJ. Comparative analysis of Staphylococcus epidermidis strains utilizing quantitative and cell surface shaving proteomics. J Proteomics 2015.
10. Mempel M, Feucht H, Ziebuhr W, Endres M, Laufs R, Gruter L. Lack of mecA transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(6):1251-5.
11. Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in Staphylococcus epidermidis blood culture strains and mucosal isolates. Infect Immun 1997; 65(3):890-6.
12. Werner FM, Covenas R. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: treatment with cultures of not drug-resistant Staphylocuccus epidermidis. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2015.
13. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, et al. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming Staphylococcus epidermidis clinical isolates from orthopaedic implant infections. Biomaterials 2005; 26(33):6530-5.
14. John JF, Harvin AM. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. Ther Clin Risk Manag 2007; 3(6):1143-52.
15. Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. Microbiol Res 2009; 164(4):404-10.
16. Hederstierna-Johnsen T, Schonheyder HC, Paulsen K. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by cefoxitin disc diffusion and oxacillin E test. A study of consecutive bacteremia isolates. *APMIS* 2005, 113(10):688-692.
17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21th ed. CLSI document M100-S21. CLSI 2011, Wayne PA
18. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbial 2001; 9(10):486-93.
19. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbial 2000; 38(2):877-80.
20. Vandecasteele S, Peetermans W, R Merckx R, Rijnders B, Van Eldere J. Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. Clinical microbiology and infection. 2003; 9(2):114-9.
21. Rahimi HM, mirzaie A, salehzadeh A. Frequency of methicillin resistant (meca) and panton-valentine leucocidin (pvl) genes among *staphylococcus aureus* isolates recovered from clinical samples of rasht hospitals. 2016.
22. Stefani S, Varaldo P. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. Clinical Microbiology and Infection. 2003; 9(12):1179-86.
23. Kronenberg A, Evison J, Schlegel M. Sentinel Surveillance of Antibiotic Resistance In Switzerland (search). Clinical Microbiology & Infection. 2008; 14:S167.
24. O'Connor C, Powell J, Finnegan C, O'Gorman A, Barrett S, Hopkins KL, et al. Incidence, management and outcomes of the first cfr-mediated linezolid-resistant Staphylococcus epidermidis outbreak in a tertiary referral centre in the Republic of Ireland. J Hosp Infect 2015; 90(4):316-21.