

بررسی اثر کشندگی سیپروفلوکسازین و محلول رویی جدا شده از استافیلوکوکوس اورئوس متأثر از سیپروفلوکسازین بر روی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های کلینیکی

منیره رحیم‌خانی^{۱*}، علیرضا مردادی^۲

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوک‌های اورئوس جزو مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به‌شمار رفته و می‌توانند عفونت‌های سطحی و یا عمقی ایجاد نمایند. در این بین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)*) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در سال‌های اخیر مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های موجود یکی از نگرانی‌های اصلی می‌باشد. بسیاری از باکتری‌ها امروزه به حداقل یکی از عوامل آنتی‌بیوتیکی و در بیشتر موارد به چندین آنتی‌بیوتیک از گروه‌های مختلف مقاومت نشان می‌دهند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، اثر کشندگی محلول رویی جدا شده از استافیلوکوک اورئوس متأثر از سیپروفلوکسازین بر روی سویه‌های بالینی *MRSA* بوده است.

روش بررسی: در تحقیق حاضر، تعداد ۸۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس که بر روی محیط BHI پراش کشت داده شده بود از بیمارستان‌های تابع دانشگاه علوم پزشکی همدان جمع‌آوری و به آزمایشگاه محل تحقیق ارسال شد. سویه‌های *MRSA* بالینی از نظر فنوتیپ و ژنوتیپ تایید شده و سپس *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* و *Minimum Bactericidal Concentration (MBC)* تعدادی از سویه‌های بالینی *MRSA* را به‌طور جداگانه در مجاورت آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین و همچنین محلول رویی (*supernatant*) که از محیط کشت مایع استافیلوکوکوس اورئوس زیر فشار سیپروفلوکسازین استخراج شده بود، به‌دست آمد.

یافته‌ها: تست‌های تشخیصی استافیلوکوکوس اورئوس از جمله رنگ‌آمیزی گرم بر روی کلنی‌ها و انجام تست‌های کاتالاز و کوآگولاز لوله‌ای انجام گرفت و مشخص شد که تمامی سویه‌ها استافیلوکوکوس اورئوس بودند. در مرحله‌ی بعدی با استفاده از PCR و پرایمر *mecA* هر ۸۳ سویه دارای ژن *mecA* بوده و از نظر ژنوتیپی نیز وجود سویه‌های *MRSA* تایید گردید. میزان متوسط *MIC* سیپروفلوکسازین و محلول رویی برای سویه‌های مختلف *MRSA* به ترتیب 0.032 mg/ml و 0.02 ml/ml و میزان متوسط *MBC* سیپروفلوکسازین و محلول رویی برای سویه‌های مختلف *MRSA* به ترتیب 0.064 mg/ml و 0.04 ml/ml به‌دست آمد. **نتیجه‌گیری:** مقادیر *MIC* و *MBC* در مورد سویه‌های *MRSA* در مجاورت سیپروفلوکسازین و در مجاورت محلول رویی از نظر عددی تقریباً مشابه بودند که این نشان‌دهنده‌ی تاثیر کشندگی ماده پروتئینی ترشح شده از استافیلوکوک‌های کشت داده شده در مجاورت مقادیر بسیار کم سیپروفلوکسازین بر روی خود باکتری‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، سیپروفلوکسازین، محلول رویی

دریافت مقاله: آذر ۱۴۰۰

پذیرش مقاله: بهمن ۱۴۰۰

* نویسنده مسئول:

منیره رحیم‌خانی؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :

rrahimkhani@tums.ac.ir

۱ دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲ کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه اپیدمیولوژی، انیستیتو پاستور، تهران، ایران

مقدمه

استافیلوکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که در همه‌جا پراکنده بوده و غالباً بر روی پوست و غشاهای مخاطی نیز به‌وفور حضور دارند. این باکتری‌ها جزو مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به‌شمار می‌روند و می‌توانند عفونت‌های سطحی و یا عمقی را ایجاد نمایند که بعضاً کشنده بوده و موجب آسیب‌های گسترده‌ای در بدن می‌شوند (۱). شیوع فراوان این باکتری‌ها در محیط و مقاومت بالای آن‌ها در سطوح خشک سبب گردیده تا به‌عنوان یک معیار آلودگی در بیمارستان‌ها در نظر گرفته شوند. به‌دلیل حضور فراوان گونه‌های استافیلوکوک بر سطح پوست و تزریق‌های مکرر در بیماران بستری، شیوع عفونت‌های ناشی از این باکتری در بیماران بستری بسیار بالاست (۱). استافیلوکوک‌ها جزو پاتوژن‌های فرصت‌طلب هستند که منجر به ایجاد بیماری‌هایی همچون عفونت‌های زخم، مسمومیت غذایی، سینوزیت، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندروم شوک سمی و عفونت‌های مجاری ادراری می‌گردد (۲).

در سال‌های اخیر مقاومت باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌های موجود یکی از نگرانی‌های اصلی می‌باشد. بسیاری از باکتری‌ها امروزه به حداقل یکی از عوامل آنتی‌بیوتیکی و در برخی موارد به چندین مورد از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند (۳ و ۴). این امر باعث شده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف‌امری اجتناب‌ناپذیر باشد و متأسفانه از نقاط مختلف جهان گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت باکتری‌ها حتی به آخرین خط درمانی موجود وجود دارد. استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد عوارض جانبی بسیاری می‌شود که از این میان می‌توان به موارد بسیار مهم از جمله، از بین رفتن فلور طبیعی انسان، که نقش اساسی در سلامت انسان ایفا می‌کنند، و همچنین ایجاد بیماری‌های اتوپی اتوایمیون اشاره کرد (۵ و ۶). مقاومت شدن باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی باعث عدم موفقیت در درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها می‌شود و در مواردی مانند عفونت‌های تهاجمی، درصد مرگ‌ومیر بیماران رو به افزایش است. در نتیجه، یافتن عوامل ضد میکروبی جدید امری ضروری به نظر می‌رسد (۷ و ۸). امروزه جایگزین‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک‌های موجود پیشنهاد می‌شوند عبارتند از: ترکیبات گیاهی، باکتریوفاژها، فاژهای لیزکننده، استفاده از مولکول‌های RNA، پروبیوتیک‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی که از منابع متفاوتی به‌دست می‌آیند. یکی از پپتیدهای ضد میکروبی که امروزه بسیار مورد توجه هستند گروهی از پپتیدها هستند که باعث ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری‌ها می‌شوند (۹ و ۱۰). بسیاری از پپتیدها در برابر هدف‌های بالینی از جمله باکتری‌های

مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیار اختصاصی عمل می‌کنند؛ که این امر یکی از مزایای این عوامل ضد میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود می‌باشد. همچنین گروهی از پپتیدها هستند که به‌صورت وسیع‌الطیف عمل می‌کنند و بر روی بسیاری از باکتری‌ها موثرند (۱۱ و ۱۲). این تحقیق بر آن است تا اثر سپروفلوکسازین و محلول رویی جداشده از استافیلوکوکوس اورئوس‌های متاثر از سپروفلوکسازین را بر روی سویه‌های *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* مورد بررسی و مقایسه قرار دهد تا میزان اثر کشندگی پلی‌پپتیدهای ساخته‌شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس که در شرایط استرس حضور آنتی‌بیوتیک تولید شده، بر روی سویه‌های *MRSA* مشخص گردد.

روش بررسی

• جمع‌آوری سویه‌ها از بیمارستان‌ها

این سویه‌ها از بیمارستان‌های تابع دانشگاه علوم پزشکی همدان جمع‌آوری و به آزمایشگاه تحقیقات دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که محل انجام طرح تحقیقاتی بود، ارسال شده و مجدداً تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جهت تایید نمونه‌ها و مقاومت آنتی‌بیوتیکی روی آن‌ها انجام گرفت. در این تحقیق پس از تعیین هویت سویه‌ها مشخص شد که تمام ۸۳ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس بودند. برای تایید ژنوتیپی سویه‌های *MRSA*، تست PCR بر روی DNA استخراج شده از باکتری‌ها و با به‌کارگیری پرایمر ژن *mecA* استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت و به این وسیله ثابت شد که تمامی سویه‌ها *MRSA* بوده‌اند.

• تهیه محلول رویی

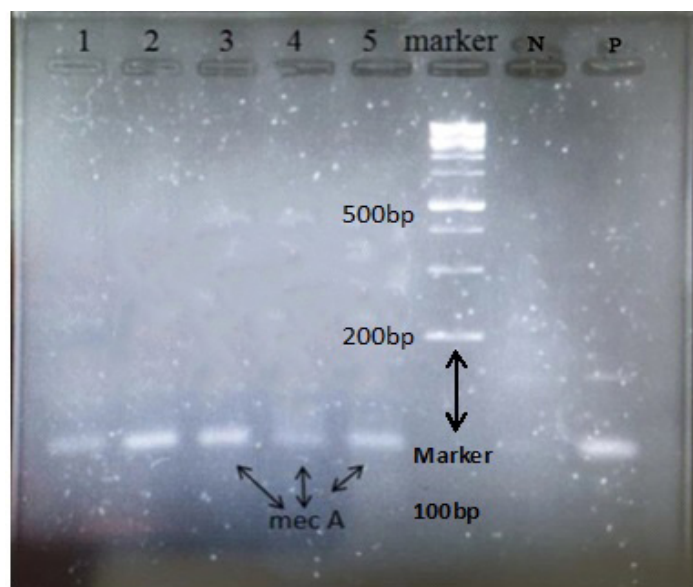
این بخش از تحقیق در مطالعات قبلی انجام گرفته است و به اختصار شرح داده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط مردادی و همکاران انجام گرفت، مایع رویی حاصل از محیط کشت مایع استافیلوکوکوس اورئوس، پس از سانتریفیوژ جمع‌آوری گردید. به این ترتیب که استافیلوکوکوس اورئوس را در محیط‌های کشت BHI حاوی سپروفلوکسازین با غلظت‌های مختلف کشت داده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، مایع رویی نمونه‌هایی که بیشترین تاثیر را در کاهش رشد باکتری‌ها داشتند انتخاب شده و به‌منظور تعیین و جداسازی ماده‌ی موثر، از دستگاه کروماتوگرافی مایع جهت تخلیص استفاده شد. در مرحله‌ی بعد، غلظت پروتئین به‌دست آمده توسط روش Bradford، آزمایش شد و برای تایید پروتئین حاصل، از الکتروفورز دو بعدی استفاده گردید. ماده‌ی موثر به‌دست آمده،

محلول رویی و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین را برای تعدادی از سویه‌های *MRSA* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی، بر طبق پروتکل ارایه شده CLSI انجام شد. برای این کار از پلیت‌های ۹۶ خانه با استفاده از محیط مولر هیتون مایع استفاده شد؛ به این ترتیب که آزمایش در ۲ مرحله صورت گرفت. در مرحله اول از رقت‌های مختلف سیپروفلوکسازین (۱/۱۶ الی ۱/۵۱۲) بر روی چند نمونه *MRSA* که به‌طور تصادفی از بین نمونه‌های زخم، خون، ادرار و خلط جدا شده بودند در پلیت‌های ۹۶ خانه به همراه محیط مایع مولر هیتون آگار به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. به‌طور همزمان همین مراحل انجام گرفت و به‌جای رقت‌های سیپروفلوکسازین از رقت‌های محلول رویی پیتید (۱/۳۲ الی ۱/۲۵۶) که از قبل تهیه شده بود استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت میزان MIC از طریق اندازه‌گیری OD چاهک‌ها در مقابل بلانک آب مقطر به دست آمد.

برای تعیین MBC از هریک از چاهک‌ها یک لوپ برداشت کرده و بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته میزان رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مشاهده شده و به این ترتیب MBC نمونه‌ها نیز به دست آمد. آخرین حد رقت مورد استفاده برای سیپروفلوکسازین رقت ۱/۲۵۶ بوده است. آخرین حد رقت به کار رفته برای محلول رویی رقت ۱/۱۲۸ بوده است.

یافته‌ها

تمامی ۸۳ نمونه/استافیلوکوکوس/اورئوس دارای ژن *mecA* بوده؛ بنابراین از نظر *MRSA* مورد تایید قرار گرفتند. با توجه به کنترل مثبت محل قرارگیری باند مربوط به *mecA* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: بررسی ژن *mecA* در نمونه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

یک پلی‌پیتید بود که بر علیه باکتری‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک موثر بود. پلی‌پیتید با وزن مولکولی نسبی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون حاصل از این مطالعه که در محلول رویی وجود داشت، فرایند ضد میکروبی وسیعی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در تحقیق انجام شده از خود نشان داد (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر از همان محلول رویی که در حرارت یخچال نگهداری شده بود، برای بررسی تاثیر بر روی سویه‌های *MRSA* استفاده شد.

• استخراج DNA از نمونه‌های *MRSA*

برای این منظور از کیت‌های استخراج DNA ساخته شده توسط شرکت پارس توس زیست فناوری (کد A101161) استفاده شد. تمامی مراحل بر اساس دستورالعمل‌های شرکت سازنده کیت انجام گرفت.

همان‌طور که ذکر شد، اولین مرحله‌ی انجام تحقیق، اثبات سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در بین سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس ارسالی از بیمارستان‌ها بود. پرایمر مورد استفاده برای تعیین هویت ژنوتیپی سویه‌های *MRSA* که مربوط به شناسایی ژن *mecA* در این باکتری بود، توسط شرکت سیناژن طراحی و ساخته شد. ساین باندهای مربوط به ژن *mecA* حدود ۱۶۰ جفت باز (bp) و سکانس پرایمرها عبارت بودند از (۲۰ و ۱۳):

F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC

R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC

• تعیین MIC و MBC

در مرحله‌ی بعدی با استفاده از روش‌های استاندارد،

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) و Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



شکل ۱، نشان‌دهنده‌ی یکی از عکس‌های الکتروفورز ژن مربوطه می‌باشد. ستون اول از سمت راست کنترل مثبت (ATCC 33591)، ستون دوم کنترل منفی، ستون سوم مارکر و مابقی ستون‌ها مربوط به *MRSA* های ارسالی از بیمارستان‌ها بود.

در مرحله‌ی بعدی MIC و MBC تعدادی از نمونه‌های *MRSA* که از نمونه‌های کلینیکی مختلفی جدا شده بودند، نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بررسی شد و سپس همین کار در حضور محلول رویی به‌دست آمده در تحقیقات قبلی انجام گرفت و اثر سیپروفلوکسازین و محلول رویی در میزان MIC و MBC بررسی گردید. بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه مربوط به سویه‌های جداشده از زخم و کمترین میزان مقاومت مربوط به سویه‌های جدا شده از ادرار بوده است.

مقدار MIC در سویه‌های مختلف جداشده در مورد محلول رویی بسیار متغیر بود؛ اما در کل سویه‌های بیماری‌زاتر و مقاوم‌تر کمترین مقدار MIC را نسبت به ماده‌ی رویی نشان دادند و بالعکس. تعیین MIC به طریق اندازه‌گیری OD چاهک‌های میکروپلیت و تعیین MBC به روش کشت هر یک از چاهک‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار بوده است.

میزان متوسط MIC سیپروفلوکسازین برای سویه‌های مختلف *MRSA*، 0.32 mg/ml به‌دست آمد. میزان متوسط MIC محلول رویی برای سویه‌های مختلف *MRSA*، 0.2 ml/ml به‌دست آمد.

میزان متوسط MBC سیپروفلوکسازین برای سویه‌های مختلف *MRSA*، 0.64 mg/ml و میزان متوسط MBC محلول رویی برای سویه‌های مختلف *MRSA*، 0.4 ml/ml به‌دست آمد.

بدین‌معناکه ماده‌ی رویی با مکانیسمی باعث ایجاد آسیب به ژنوم باکتری گشته است. پس می‌توان نتیجه گرفت که این محلول رویی که حاصل کشت باکتری در محیط BHI بوده است یا مکانیسم دیگری سیستم توکسین آنتی‌توکسین را فعال کرده است و یا دچار تغییراتی شده است که ماده‌های سمی برای ژنوم باکتری شکل گرفته است.

بحث

برای محققان همیشه این سوال مطرح بوده است که چگونه باکتری‌ها شرایط محیطی را بررسی می‌کنند و به‌صورت کاملاً هوشمندانه برای حفظ بقای

حداقلی جمعیت خود تلاش می‌کنند؛ به‌صورتی که در ساده‌ترین شرایط رشد یعنی محیط‌های کشت آزمایشگاهی باکتری‌ها روند نمودار رشد، فاز تاخیری، فاز رشد، فاز سکون و مرگ را برنامه‌ریزی می‌کنند.

تاکنون تحقیقی در مورد سیستم چگونگی مرگ برنامه‌ریزی شده در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های کلینیکی در ایران انجام نگرفته است و تحقیقات انجام گرفته در ایران از نظر وجود سیستم مرگ برنامه‌ریزی شده در باکتری‌های اشریشیاکلی و اسنیتوباکتر بوده است.

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که سیستم توکسین آنتی‌توکسین یا به‌عبارتی مرگ برنامه‌ریزی شده در *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط استرس مانند مقادیر کمتر از حداقل دوز کشندگی اریترومایسین و تتراسایکلین و حتی در برخی سویه‌ها در شرایط بدون استرس دچار تغییر در بیان می‌گردد که برخی

بر این باور هستند که این امر در پاتوژنیسیته این باکتری نقش بسزایی دارد ولی تاکنون عملکرد قاطعی برای این سیستم ذکر نشده است (۱۵ و ۱۴). در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. به این ترتیب که وجود ژن *mecA* در ۸۳ نمونه *MRSA* جداشده از نمونه‌های کلینیکی به اثبات رسید. سپس سویه‌های مورد مطالعه، تحت استرس آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین قرار گرفتند و پس از

تعیین MIC و MBC تقریباً در تمامی نمونه‌ها وجود این ژن‌ها تحت استرس سیپروفلوکسازین به اثبات رسید. همین اعمال مجدداً تحت تاثیر پیتید محلول رویی بر روی نمونه‌های *MRSA* انجام گرفت و تقریباً همان نتایج به‌دست آمد.

در تحقیق حاضر این سیستم در حضور استرس ناشی از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین انجام گرفت و علاوه بر آن در حضور استرس محلول رویی که از تحقیق قبلی به‌دست آمده بود نیز بیان ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی شده بررسی گردید. در واقع *استافیلوکوکوس اورئوس* در مجاورت مقادیر

غیرکشندگی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین و در محیط‌های کشت مایع قرار داده شده و پس از انکوباسیون لازم سانتی‌فیوژ شده و محلول رویی جدا شده، میزان سیپروفلوکسازین موجود در محیط قادر به نابودی کامل *استافیلوکوکوس اورئوس* های موجود در محیط کشت نبود؛ ولی ژن‌های مربوط به سیستم مرگ

برنامه‌ریزی شده تحت استرس آنتی‌بیوتیک را فعال کرده و منجر به تولید پلی‌پپتیدی شد که بر روی سایر سویه‌های *MRSA* که در تحقیق حاضر از نمونه‌های کلینیکی مختلف از قبیل زخم و ادرار و مایع مغزی-نخاعی و ... جدا شده بود، اثر کشندگی و بازدارندگی رشد داشته که تقریباً این اثرات مشابه اثر

رویی بر روی بسیاری دیگر از باکتری‌ها دیده شده بود، تصور بر سیستم تیپ II بود که نتایج به دست آمده نشان داد که این سیستم در این باکتری و با این محلول رویی واکنش خاصی نشان می‌دهد و تاییدی بر مطالعه‌ی قبلی بود (۱۳).

نتیجه‌گیری

در ۸۳ نمونه *MRSA* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی (پس از تایید فنوتیپ و ژنوتیپ) از قبیل خون، زخم، ادرار، CSF، ترشحات ریه و ... در این طرح اثر سیپروفلوکسازین و محلول رویی در مرگ باکتری‌های مورد استرس به تایید رسیده است؛ به این ترتیب که پس از استرس باکتری‌ها توسط آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین، بیان ژن‌های مربوط به مرگ برنامه‌ریزی شده در تعدادی از نمونه‌های *MRSA* دیده شد. مقادیر MIC و MBC در مورد سویه‌های *MRSA* در مجاورت سیپروفلوکسازین و در مجاورت محلول رویی از نظر عددی تقریباً مشابه بودند که این نشان‌دهنده‌ی تاثیر کشندگی ماده پروتئینی ترشح شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* های کشت داده شده در مجاورت مقادیر بسیار کم سیپروفلوکسازین بر روی خود باکتری‌ها می‌باشد.

چنین مطالعاتی نشان‌دهنده‌ی این است که این محلول رویی توانایی بالقوه‌ای برای کاندید شدن به عنوان یک ماده ضد میکروبی مناسب دارد و البته نیاز به مطالعات بسیار بیشتری بر روی سایر گروه‌های باکتری‌هاست.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر پژمان کرمی دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان و آقای امید زارعی، کارشناس ارشد باکتری‌شناسی که تامین‌کننده‌ی سویه‌های *MRSA* بالینی و محلول رویی بوده‌اند، تشکر و سپاسگزاری می‌نماید. مقاله‌ی حاضر بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی با شماره ۳۸۸۰۵ مورخ ۱۳۹۷/۲/۳۱ و کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1397.093 بوده که در دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

References

1. Chang YC, Yang CY, Sun RL, Cheng YF, Kao WC & Yang PC. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Scientific Reports* 2013; 3(1863): 1-7.
2. Sood S, Malhotra M, Das BK & Kapil A. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. *Indian Journal of Medical Research* 2008; 128(2): 111-21.

مستقیم آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین بر روی یکایک سویه‌های *MRSA* بود. برخی مطالعات، بیانگر این است که سیستم مرگ برنامه‌ریزی شده در شرایط استرس آنتی‌بیوتیکی دچار افزایش بیان می‌گردد و مانع از رشد باکتری می‌شود که این امر به زنده ماندن باکتری در حضور آنتی‌بیوتیک کمک می‌کند (۱۶).

دیگر مطالعات نشان داده که Omega-Epsilon-Zeta در سویه‌های *MRSA* در یک موایل ژن یافت می‌شود و در حضور متی‌سیلین در محیط با فعال شدن این سیستم سنتز دیواره متوقف شده و باکتری را از اتولیز نجات می‌دهد (۱۷). در مطالعه مروری نقش تیپ دو سیستم توکسین آنتی‌توکسین در پیدایش سلول‌های persister / استافیلوکوکوس اورئوس تاکید شده است که منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری می‌گردد (۱۸). در مطالعه‌ی Schuster و همکاران نشان داده شد که سیستم‌های مرگ برنامه‌ریزی شده در سویه‌های *MRSA* بسیار پایدار می‌باشند و نقش بسزایی در تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها ایفا می‌کنند (۱۹).

مطالعه‌ای دیگر در مورد سیستم‌های پاسخ‌دهنده به آسیب‌های ژنتیکی به چاپ رسید که همگی این مطالعات و نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه‌ی قبلی این تیم بسیار رضایت‌بخش است (۲۰). چراکه مهم‌ترین عامل و نکته مدنظر این تحقیق و دیگر تحقیق‌ها حول یک محور است و آن انتقال و تقلید سیگنالی که منجر به بیش از حد فعال شدن سیستم‌های تعمیر آسیب‌های ژنتیکی در باکتری می‌گردد و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده را به راه می‌اندازد. ساز و کاری که باکتری‌ها برای حفاظت خود طی میلیون‌ها سال تکامل به دست آورده‌اند و به راحتی یک المنت متحرک نمی‌توانند کسب کنند یا از دست بدهند. بنابراین چگونگی مرگ باکتری‌های مقاوم در مسیر کشف قرار گرفته است.

یکی از مطالعات، بیانگر این موضوع بود که استرس ناشی از سیپروفلوکسازین باعث آزادسازی رادیکال آزاد اکسیژن در محیط شده است و مطالعه‌ی دیگر پپتیدی را یافتند و توالی‌یابی کردند که یک EDF است و در *استافیلوکوکوس اورئوس* با تحریک سیستم تیپ I باعث مرگ برنامه‌ریزی شده در این باکتری می‌گردد (۲۱ و ۱۸)؛ اما از آنجاکه در مطالعه‌ی قبلی اثر ضد میکروبی این محلول



3. Allerberger F & Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16(1): 16-23.
4. Amitai S, Kolodkin Gal I, Hananya Meltabashi M, Sacher A & Engelberg Kulka H. Escherichia coli MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both “death proteins” and “survival proteins”. *PLoS Genet* 2009; 5(3): e1000390.
5. Bayles KW. Bacterial programmed cell death: Making sense of a paradox. *Nature Reviews Microbiology* 2014; 12(1): 63-9.
6. Francino MP. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology* 2016; 6(1543): 1-11.
7. Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature* 2011; 476(7361): 393-4.
8. Breukink E & De Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1999; 1462(1-2): 223-34.
9. Breukink E, Ganz P, De Kruijff B & Seelig J. Binding of nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* 2000; 39(33): 10247-54.
10. Rungelrath V & Deleo FR. Staphylococcus aureus, antibiotic resistance, and the interaction with human neutrophils. *Antioxidants and Redox Signaling* 2021; 34(6): 452-70.
11. Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers O, Sahl HG & De Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 1999; 286(5448): 2361-4.
12. Brotz H, Josten M, Wiedemann I, Schneider U, Gotz F, Bierbaum G, et al. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology* 1998; 30(2): 317-27.
13. Mordadi AR, Hajiahmadi F, Zarei O & Arabestani MR. Identification and purification of quorum sensing peptides causing apoptosis in Staphylococcus aureus as new treatment antibiotics. *Journal of Isfahan Medical School* 2018; 35(457): 1725-31[Article in Persian].
14. Bukowski M, Lyzen R, Helbin WM, Bonar E, Szalewska Palasz A, Wegrzyn G, et al. A regulatory role for Staphylococcus aureus toxin-antitoxin system PemIKSa. *Nature Communications* 2013; 4(2012): 1-10.
15. Donegan NP & Cheung AL. Regulation of the mazEF toxin-antitoxin module in Staphylococcus aureus and its impact on sigB expression. *Journal of Bacteriology* 2009; 191(8): 2795-805.
16. Fu Z, Tamber S, Memmi G, Donegan NP & Cheung AL. Overexpression of MazFsa in Staphylococcus aureus induces bacteriostasis by selectively targeting mRNAs for cleavage. *Journal of Bacteriology* 2009; 191(7): 2051-9.
17. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; 34(5): 877-86.
18. Schuster CF & Bertram R. Toxin-antitoxin systems of Staphylococcus aureus. *Toxins (Basel)* 2016; 8(5): 140.
19. Schuster CF, Mechler L, Nolle N, Krismer B, Zelder ME, Gotz F, et al. The MazEF toxin-antitoxin system alters the β -lactam susceptibility of Staphylococcus aureus. *PLoS One* 2015; 10(5): e0126118.
20. Dufour D & Lévesque CM. Cell death of Streptococcus mutans induced by a quorum-sensing peptide occurs via a conserved streptococcal autolysin. *Journal of Bacteriology* 2013; 195(1): 105-14.
21. Siripornmongkolchai T, Chomvarin C, Chaicumpar K, Limpai boon T & Wongkhum C. Evaluation of different primers for detecting mecA gene by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2002; 33(4): 758-63.

Survey of the Lethal Effect of Ciprofloxacin and Supernatant Isolated from *Staphylococcus Aureus* under the Stress of Ciprofloxacin on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens

Monireh Rahimkhani^{1*} (Ph.D.), Ali Reza Mordadi² (M.S.)

¹ Associated Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Master of Science in Microbiology, Department of Epidemiology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

Abstract

Received: Nov 2021
Accepted: Jan 2022

Background and Aim: *Staphylococcus aureus* is gram-positive coccus that is one of the most important causes of nosocomial infections and cause cutaneous or subcutaneous infections. Among these bacteria Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) are the most important. The aim of the present study was to investigate the lethal effect of a substance isolated from *Staphylococcus aureus* under the influence of ciprofloxacin on clinical strains of *MRSA*.

Materials and Methods: In the present study, 83 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals affiliated to Hamadan University of Medical Sciences and were referred to the research laboratory in faculty of Allied Medical Sciences. Strains of *Staphylococcus aureus* were identified genotyping and phenotyping by PCR test to prove the presence of *mecA* gene. Minimums Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were examined on number of *MRSA* in the presence of ciprofloxacin antibiotic as well as supernatant extracted from *Staphylococcus aureus* fluid culture medium under ciprofloxacin stress.

Results: Diagnostic tests of *Staphylococcus aureus*, including gram staining, catalase and coagulase tests were performed and all strains were *Staphylococcus aureus*. In the next step, the strains were genetically tested for confirming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, by PCR test and present of *mecA* gene. All 83 samples had *mecA* genes and were *MRSA*. The mean MIC of ciprofloxacin and supernatant for different strains of *MRSA* were 0.032 mg/ml and 0.02 ml/ml, respectively, and the mean levels of MBC ciprofloxacin and supernatants for different strains of *MRSA* were 0.064 mg/ml and 0.04 ml/ml, respectively.

Conclusion: The effect of ciprofloxacin and supernatant on the death of stressed bacteria has been confirmed so that after bacterial stress by the antibiotic ciprofloxacin expression of genes related to programmed death was seen in a number of *MRSA* samples. The MIC and MBC values for *MRSA* strains in the presence of ciprofloxacin and the supernatant showed similar results, indicating the lethal effect of the protein secreted by cultured staphylococci in the presence of low amounts of ciprofloxacin on the bacteria themselves.

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (*MRSA*), Supernatant, Ciprofloxacin

* Corresponding Author:
Rahimkhani M
Email:
rrahimkhani@tums.ac.ir