بررسی شیوع استافیلوکوک آرئوس مقاوم به متی‌سیلین با روش‌های انتشار از دیسک و مولکولی در بخش‌های مراقبت‌های ویژه و اورژانس در یکی از بیمارستان‌های آموزشی تهران

شفیع قربانی طاژاندره[۱]، دکتر عباسعلی ایمانی فولادی[۲]*، دکتر محمدرضا نورانی[۳]

تاریخ دریافت: 1391/09/10، تاریخ پذیرش: 1391/12/03

چکیده

پیش زمینه و هدف: استافیلوکوک آرئوس مقاوم به متی سیلین یک پاتوژن عمده و مهم در ایجاد عفونت‌های جدی در ایران و سایر کشورها است . به دلیل شیوع مقاومت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان و مبارزه علیه آن بسیار مشکل شده است بنابراین هدف این مطالعه تعیین فراوانی ژن مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرئوس به روش PCR و بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت اگزاسیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار از دیسک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در طی سال ۱۳۹۰ بر روی ۷۳ نمونه از استافیلوکوکوس آرئوس جداسازی شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس صورت گرفت. در این تحقیق تشخیص فنوتیپی به روش انتشار از دیسک انجام شد، و به منظور تشخیص ژنوتیپی یک جفت آغازگر اختصاصی جهت تشخیص ژن *mecA* توسط نرم‌افزار AlleleID (version 6) طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد. سپس تشخیص این ژن با آغازگرهای طراحی شده بهینه‌سازی شد، و شیوع آن از نمونه جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس، به روش PCR مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های این بررسی به روش PCR نشان داد که از ۷۳ ایزوله بدست آمده از نمونه‌های بالینی، ۸۹ درصد سویه‌ها (۶۵مورد) ژن مقاومت به متی سیلین را دارند . ولی در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک، فقط ۷۴ درصد سویه‌ها (۵۴ مورد) مقاومت به اگزاسیلین را نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش به روش PCR نشان می‌دهد که از ۷۳ نمونه بالینی، ۸۹ درصد ایزوله‌ها ژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان می‌دهند. و در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار، فقط ۷۴ درصد مقاومت را نشان داده‌اند. به عنوان نتیجه‌گیری، مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس آرئوس به ۸۹ درصد رسیده است و میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی به بیش از ۹۵ درصد رسیده است .

کلید واژه‌ها: استافیلوکوک آرئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، متی سیلین، MRSA

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوم، ص ۱۲۰-۱۱۰، اردیبهشت ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

Email: imanifouladi.a@gmail.com

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند، شناخته شده است (۱). استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)[۴] همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است (۳، ۲) که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینولون‌ها و ماکرولیدها کسب کرده است (۱). بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین و تیکوپلانین در دسترس هستند (۴، ۵).

---

[۱] کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

[۲] دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) (نویسنده مسئول)

[۳] دانشیار مرکز تحقیقات آسیب¬های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

[۴] Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس آرئوس تا قبل از سال ۱۹۵۰، شامل تجویز پنی‌سیلین G بود، به دلیل رشد روز افزون مقاومت به پنی‌سیلین‌ها در اواخر ۱۹۵۰ نگرانی فزاینده‌ای را به وجود آمد (۶).

سویه‌های مقاوم به طور تیپیک تولید آنزیمی به نام بتالاکتاماز می‌کردند که در اثر آن حلقه بتالاکتام، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مقاوم به هیدرولیز آنزیم بتالاکتاماز شدند، نتیجه این تلاش‌ها در سال ۱۹۵۹ به سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها نیمه سنتتیک از قبیل متی‌سیلین، اگزاسیلین و نافسیلین منجر شد. متأسفانه طولی نکشید که به دنبال استفاده از این داروها هم، استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی‌سیلین پدیدار شد. اولین سویه‌های مقاوم به این قبیل داروها در سال ۱۹۶۱ در انگلستان شناسایی شدند (۷-۹). مقاومت به این داروها ناشی از تولید بتالاکتاماز توسط باکتری نبود، بلکه مربوط به بیان اضافی یک پروتئین باند شونده به پنی‌سیلین به نام PBP_{2a}[1] بود که از گونه‌های دیگر باکتریایی کسب شد (۱۰). اطلاعات در دسترس نشان داد که ژن ساختمانی این مقاومت به نام mecA کد کننده‌ی PBP_{2a} در سویه‌های مقاوم وجود دارد که در سویه‌های حساس وجود ندارد (۹، ۱۰). سویه‌های MRSA پروتئین‌های باند شونده به پنی‌سیلین (PBP) را تولید می‌کنند که با تمایل پایین به آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتتیک از قبیل متی‌سیلین متصل می‌شوند، در نتیجه دارو بر روی باکتری اثری نخواهد داشت (۶، ۹). برعکس در باکتری فاقد ژن mecA، این آنتی‌بیوتیک‌ها با تمایل بالا به PBP در دیواره سلولی باکتری باند شده و سبب لیز دیواره سلولی و سرانجام مرگ باکتری می‌گردند (۶، ۹). منشأ ژن mecA، مشابه اسید آمینه‌های بیان شونده توسط ژن mecA استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین به نام استافیلوکوکوس سیوری (S.ciuri) می‌باشد (۸). ژن mecA قطعه‌ای به اندازه ۲/۱ کیلو باز است که در ناحیه متحرک ژنومیک به نام SCCmecA[2] قرار دارد. در حال حاضر ۷ تیپ اصلی SCCmecA شناسایی شده است (۱۱-۱۴). ژن‌هایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ناحیه SCCmecA وجود دارند که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگونی می‌شوند و همچنین این ناحیه (SCCmecA) حاوی دو بخش ضروری‌اند که عبارتند از: کمپلکس ژن ccr و کمپلکس ژن mecA (۱۵). ژن‌های ccr[3] از کلاس invertase resolves هستند و در تمامی کاست‌های کروموزومی ژن مقاومت به متی‌سیلین وجود دارند (۱۶).

به علت بالا بودن میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های بیمارستانی سویه‌های MRSA، تعیین الگوی مقاومت منطقه‌ای و محلی به منظور راهنمایی مناسب جهت استفاده از آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله سویه‌های MRSA ضروری است (۱۰). شیوع MRSA به مقدار زیادی در بین کشورهای مختلف و حتی از یک بیمارستان به بیمارستان دیگر در یک کشور متفاوت است. بنابراین تعیین الگوی مقاومت منطقه‌ای و جغرافیای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح یک کشور به منظور راهنمای مناسب جهت درمان عفونت‌ها MRSA و کنترل آن کاملاً ضروری و مناسب می‌باشد ثابت شده است که محل جغرافیایی می‌تواند یک فاکتور ریسک برای نشان دادن عفونت‌های MRSA باشد (۱۷). بر این اساس، نه تنها با تشخیص این ایزوله‌ها، می‌توان از تجویز نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها در مورد بیماران جلوگیری کرد، بلکه از گسترش ایزوله‌ها مقاوم به دارو در بیمارستان‌ها مختلف جلوگیری خواهد شد. بنابراین هدف از این مطالعه شناسائی و تعیین فراوانی سویه‌های MRSA به دو روش فنوتیپی و مولکولی در ایزوله‌های بالینی جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس آرئوس از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس در یکی از بیمارستان‌های آموزشی تهران به ترتیب با فراوانی (۵۲/۱%)۳۸ و (۴۷/۹%)۳۵ در طی سال ۱۳۹۰ جمع آوری شدند. همه‌ی ایزوله‌ها با تست‌های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، تست DNase و تخمیر قند مانیتول (سیگما، آمریکا) تایید گردیدند (۱۸).

- *تعیین فنوتیپی استافیلوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*

آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) در محیط مولر-هینتون آگار (مرک، آلمان) بر اساس دستورالعمل CSLI[4] انجام شد (۱۸). حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین (۱μg)، اریترومایسین (۱۰μg)، آمپی‌سیلین (۱۰μg)، آموکسی‌سیلین (۱۰μg)، ایمی‌پنم (۱۰μg)، پنی‌سیلین (۱۰un)، تتراسایکلین (۳۰μg)، داکسی‌سایکلین (۳۰μg)، سفتریاکسون (۳۰μg)، سیپرفلوکساسین (۵μg)، کلرامفنیکل (۳۰μg)، سینوکساسین (۱۰۰μg)، کلیندامایسین (۲μg)، کوتریموکسازول (۲۳/۷۵μg+ ۱/۲۵) و ونکومایسین (۳۰μg) تعیین شد.

[1] penicillin binding protein
[2] staphylococcal cassette chromosome mec
[3] Cassette chromosome recombinase
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

- *تعیین ژنوتیپی استافیلوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین*

استخراج ژنوم باکتریایی با استفاده از کیت استخراج ژنوم (No: K-3032، شرکت Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. در این روش، باکتری‌ها در محیط LB- Broth به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس بر اساس دستورالعمل کیت، استخراج ژنوم باکتریایی صورت گرفت (۱۹).

در این تحقیق یک جفت آغازگر اختصاصی توسط نرم‌افزار AlleleID (version 6) طراحی و سپس توسط شرکت سیناژن سنتز شد. که مشخصات آغازگرهای طراحی شده به شرح زیر می‌باشد.

mecA-F 5′-TGAGTTGAACCTGGTGAAGTT-3′

mecA-R 5′-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGG-3′

تشخیص ژن mecA به طول ۸۵۵ bp با آغازگرهای طراحی شده بهینه سازی و با انجام تعیین توالی تایید شد. شیوع ژن mecA در بین نمونه‌های جدا شده از بیماران، به روش PCR تشخیص داده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل:

PCR ۲/۵ µl، Mgcl2 ۱ µl (۵۰mM)، DDW۱۶/۵ µl بافر ۱۰x، dNTPmix ۱ µl (۲/۵mM)، Taq DNA ۱ µl (۵un) Polymerase، (۱۰PM) µl ۱ از هر کدام از آغازگرها انجام شد. واکنش‌های PCR در ترموسایکلر (مدل اپندورف) و با شرایط زیر انجام شد: واسرشت اولیه در دمای C ° ۹۴ به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ۱- باز شدن دو رشته در چرخه، در دمای C ۹۴° به مدت ۴ دقیقه ۲- اتصال تدریجی آغازگرها به الگو[1] در دمای C ° ۵۷ به مدت ۳۰ ثانیه ۳- ساخت رشته مکمل [2] در دمای C ° ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و در پایان چرخه ۳۵ تکمیل رشته ناقص[3] در دمای C ° ۷۲ به مدت ۵ دقیقه. محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد بررسی شد. همزمان از ژنوم استخراج شده از ایزوله MRSA ATCC 43300 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شد .

- *آزمون آماری*

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (V17) و روش Fisher's exact test و χ^2 انجام گرفت که همه موارد با، $P<۰/۰۵$ معنی دار بود.

[1] Annealing
2 Extension
3 Final Extension

یافته

۷۳ نمونه استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس شامل ۵۲(۷۱/۲%) بیمار مرد و ۲۱(۲۸/۸%) بیمار زن بودند. افراد بیمار در این تحقیق به ۹ گروه سنی دسته‌بندی شده است که توزیع فراوانی MRSA و MSSA گروه‌های سنی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه بر اساس محل جداسازی نوع عفونت ایجاد شده در بیماران، ۸ نوع نمونه در نظر گرفته شد(جدول شماره ۱)، که میزان شیوع MRSA و MSSA در انواع نمونه‌های بالینی در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. با توجه به اینکه نمونه‌های جدا شده از بخش‌های مراقبت‌های ویژه و اورژانس بودند. میزان فراوانی MRSA در این بخش‌ها به ترتیب ۳۵(۹۲/۱%) و ۳۰(۸۵/۷) است.

جدول شماره (۱): توزیع فراوانی انواع نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس آرئوس

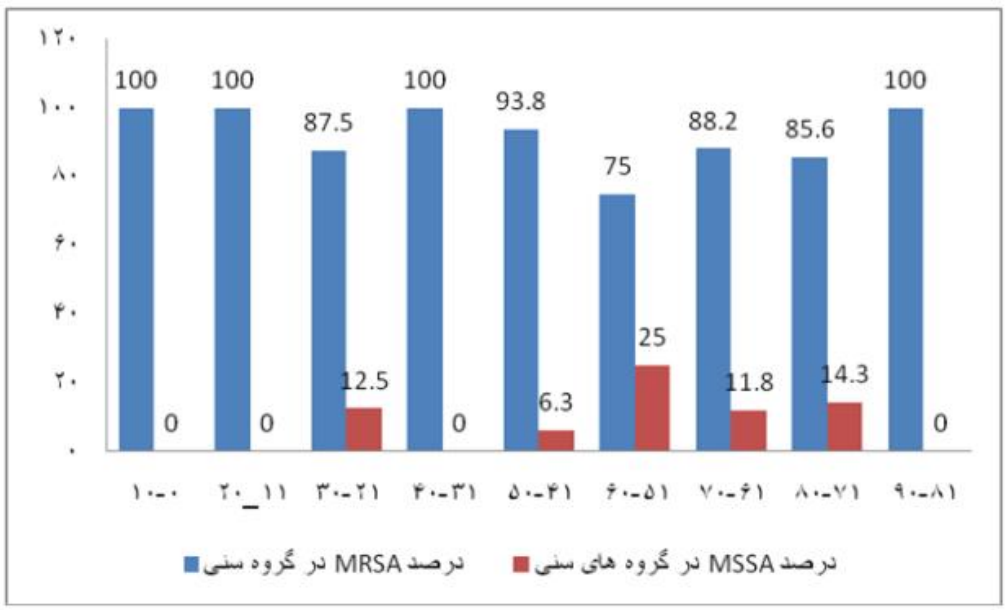
نمونه	فراوانی	درصد فراوانی
زخم	۴۱	۵۶/۲
ادرار	۱	۱/۴
خون	۱۷	۲۳/۳
تراشه	۵	۶/۸
خلط	۱	۱/۴
بال	۵	۶/۸
استخوان	۱	۱/۴
چست تیوپ	۲	۲/۷
کل	۷۳	۱۰۰

میزان مقاومت سویه‌های MRSA و MSSA به ۱۵ آنتی‌بیوتیک مختلف به روش DDA در جدول شماره ۳ ارائه شده است. بیشترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین ۶۹(۹۴/۵%) و کوتریموکسازول ۶۶(۹۰/۴%) بوده است. در تحقیق حاضر همه‌ی ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرئوس حساس به ونکومایسین بودند. همچنین مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی به ترتیب به چند دسته آنتی‌بیوتایپ آنتی‌بیوتیکی که در آن به ترتیب به گروه‌های، مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک، مقاومت به چهار آنتی‌بیوتیک و تا مقاومت به چهارده آنتی‌بیوتیکی دسته‌بندی شده است که نتایج

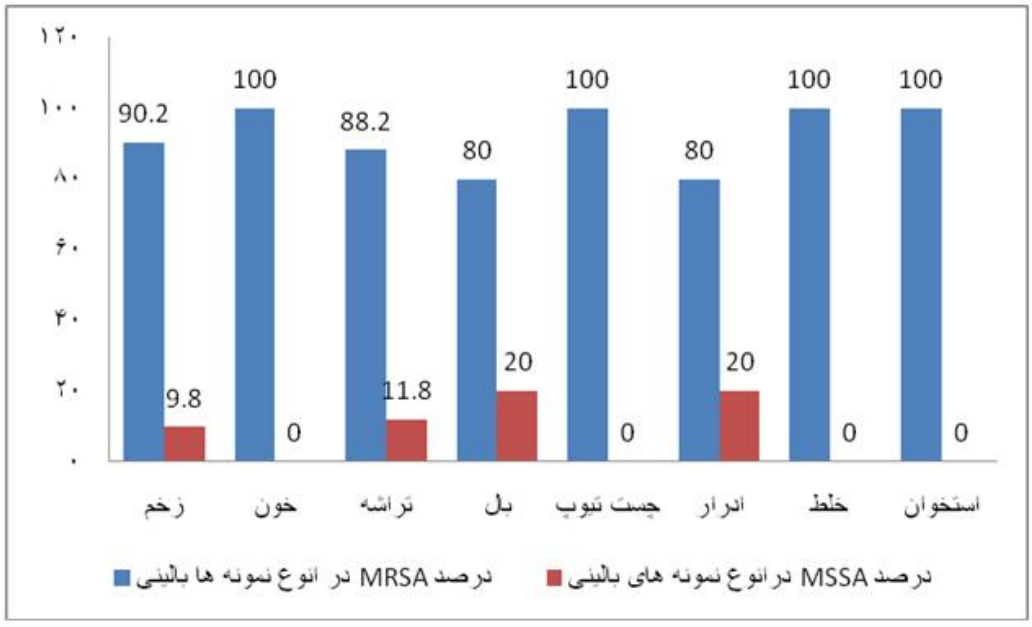
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

مقاومت نسبت دسته‌های مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی در جدول شماره ۳ نشان داده شده است که در کل (۹۵/۹%)۷۰ ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرئوس مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک و بیشتر از سه آنتی‌بیوتیک را نشان دادند و (۲۰/۵%)۱۵ ایزوله مقاومت به همه‌ی چهارده آنتی‌بیوتیک را نشان داده‌اند.

در روش انتشار از دیسک (۷۴%)۵۴ ایزوله استافیلوکوکوس آرئوس به اگزاسیلین مقاوم بودند (جدول شماره ۲)، اما به روش مولکولی PCR (۸۹%)۶۵ سویه دارای ژن mecA بودند (شکل ۱).



نمودار شماره (۱): توزیع فراوانی MRSAو MSSA در گروه‌های سنی



نمودار شماره (۲): توزیع فراوانی MRSAو MSSA در انواع نمونه‌های بالینی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

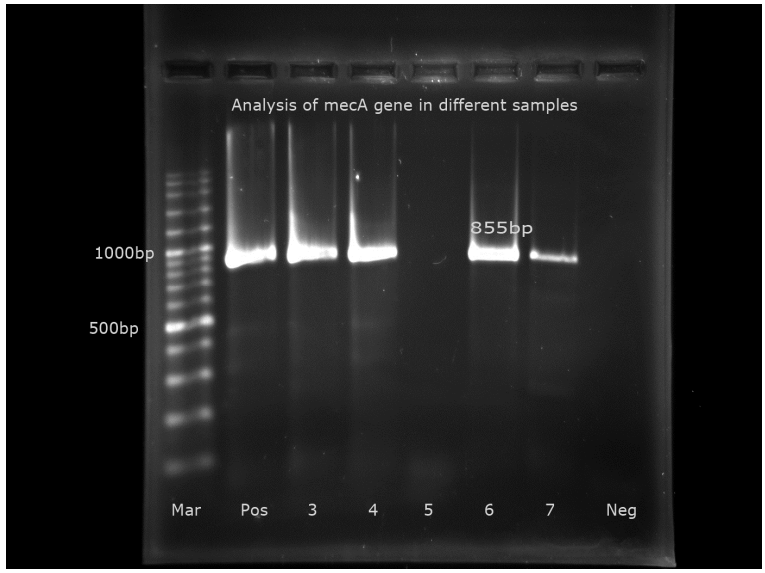
جدول شماره (۲): توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ایزوله‌های MRSA و MSSA با روش دیسک دیفیوژن آگار

آنتی‌بیوتیک‌ها	محتویات دیسک‌ها برحسب µg	تعداد ایزوله‌های MRSA			تعداد ایزوله‌های MSSA		
		حساس	حد واسط	مقاوم	حساس	حد واسط	مقاوم
اگزاسیلین	۱	۸	۳	۵۴	۸	۰	۰
اریترومایسین	۱۵	۲۱	۵	۳۹	۴	۰	۴
آمپی‌سیلین	۱۰	۹	۳	۵۳	۱	۰	۷
آموکسی سیلین	۱۰	۸	۷	۵۰	۰	۰	۸
ایمی‌پنم	۱۰	۲۵	۴	۳۵	۲	۰	۶
پنی‌سیلین	۱۰units	۱	۰	۶۴	۲	۱	۵
تتراسایکلین	۳۰	۲۰	۴	۴۱	۳	۰	۵
داکسی سایکلین	۳۰	۲۴	۱	۴۰	۴	۰	۴
سفتریاکسون	۳۰	۲۰	۷	۳۸	۲	۱	۵
سیپروفلوکساسین	۵	۲۹	۰	۳۶	۱	۲	۵
سی‌نوکسین	۱۰۰	۲۹	۳	۳۳	۴	۰	۴
کلرامفنیکل	۳۰	۲۹	۱	۳۴	۵	۰	۳
کلینداماسین	۲	۲۰	۷	۳۸	۲	۱	۵
کوتریموکسازول	۱/۲۵+۲۳/۷۵	۶	۱	۵۸	۰	۰	۸
ونکومایسین	۳۰	۶۲	۳	۰	۸	۰	۰

جدول شماره (۳): توزیع فراوانی دسته مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی (MDR) در سویه‌های MRSA و MSSA

الگوی مقاومت چند آنتی‌بیوتیک	MRSA	MSSA	کل	مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی
۱	۰	۰	۰	Non MDRSA
۲	۳	۰	۳	
۳	۱	۰	۱	Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* (MDRSA)
۴	۸	۱	۹	
۵	۸	۱	۹	
۶	۱	۰	۱	
۷	۴	۲	۶	
۸	۲	۰	۲	
۹	۲	۰	۲	
۱۰	۱	۱	۲	
۱۱	۲	۱	۳	
۱۲	۸	۲	۱۰	
۱۳	۱۰	۰	۱۰	
۱۴	۱۵	۰	۱۵	
	۶۵	۸	۷۳	کل

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]



شکل شماره (۱): نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن mecA در ایزوله‌های بالینی بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد.
چاهک ۱: Ladder bp ۱۰۰، چاهک۲: سوش کنترل مثبت، دارای ژن mecA (MRSA ATCC 43300)،
چاهک ۳ تا ۷: نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس آرئوس، چاهک ۸: Neg کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های ناشی از این بررسی به روش PCR نشان داد که (۸۹%)۶۵ از ایزوله‌های استافیلوکوکوس آرئوس بدست آمده از دو بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس مورد مطالعه، دارای ژن mecA هستند. نتیجه سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش DDA نشان می‌دهد که (۸۸/۶%)۶۲ از ایزوله‌های MRSA دارای مقاومت چند داروئی هستند که این میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی خیلی بالا می‌باشد. همچنین در این بررسی ۳ مورد از ایزوله‌ها کاهش حساسیت به وانکومایسین را هم نشان می‌دهند. در این بررسی علاوه بر استفاده از تعیین حساسیت به دیسک اگزاسیلین به روش DDA در تشخیص ایزوله‌های MRSA، از تکنیک PCR هم استفاده شد، اما به دلیل بیان غیر یکنواخت مقاومت به متی‌سیلین در این قبیل ایزوله‌ها، اغلب این ایزوله‌ها ممکن حساس تفسیر شوند. سویه‌هایی از MRSA که از نظر تعداد و سرعت رشد در یک جمعیت میکروبی ضعیف‌تر از سویه‌های غیر مقاوم رشد می‌کند. بنابراین اغلب به اشتباه MSSA تشخیص داده می‌شوند و همچنین بیان ژن مقاومت به متی‌سیلین خیلی وابسته به شرایط کشت از قبیل درجه حرارت، PH، محیط کشت و محیط کشت حاوی Nacl است در مجموعه‌ی این عوامل باعث بیان غیر یکنواخت ژن مقاومت به متی‌سیلین می‌شود که در نهایت ممکن است باکتری مقاوم به متی‌سیلین، حساس به متی‌سیلین تشخیص داده شود (۲۰، ۲۱). علت اصلی استفاده از اگزاسیلین به جای متی سیلین در شناسایی سویه‌های MRSA این است، که اگزاسیلین در طولانی مدت فعالیت خود را حفظ می‌کند . بنابراین در شناسایی سویه‌های هترورزیستانس بهتر از متی سیلین است (۲۰). شناسایی صحیح MRSA با روش‌های روتین در آزمایشگاه‌ها مشکل است. به دلیل این که ممکن است سویه‌های مقاوم و حساس در یک کشت به طور همزمان وجود داشته باشند و این هترورزیستانسیتی به علت رشد ضعیف سویه‌های مقاوم در مقابل سویه‌های حساس در تشخیص ایجاد اشکال می‌کند. به دلیل اینکه روش PCR تحت تأثیر متغیرهای محیط کشت قرار نمی‌گیرد، لذا در تشخیص این سویه‌ها بسیار توانا است (۲۲، ۲۳). بنابراین در این مطالعه بر اساس استفاده از این تکنیک میزان دقیق فراوانی سویه‌های MRSA تعیین شد و با نتایج بررسی فنوتیپی مورد مقایسه قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۲ توسط کیم و همکاران طی یک برنامه نظارت سراسری در کشور کره، شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و کاست‌بندی کروموزومی ژن مقاومت به متی‌سیلین و همچنین پروفایل ژن‌های توکسین در باکتری استافیلوکوکوس آرئوس، بررسی شد، در این تحقیق ۲۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس آرئوس که توسط روش‌های بیوشیمایی تایید شده بودند، به دو روش DDA و PCR بررسی شدند. از بین ۲۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده، ۱۷۲ (۶۸،۳ ٪) ایزوله، مقاومت به دیسک اگزاسیلین نشان دادند و در بررسی توسط روش PCR، ۱۷۲ (۶۸،۳ ٪) مورد از ایزوله‌ها دارای ژن mecA و ۸۰ سویه فاقد ژن mecA تشخیص داده شدند (۲۴). در حالی که در مطالعه ما میزان ایزوله‌های دارای ژن mecA در

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

مقایسه با نتایج فنوتیپی بیشتر بوده است. به طور کلی دو عامل بر اختلاف بین روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تأثیر گذار هستند. اولاً هتروزیستانت بودن سویه‌ها و ثانیاً ممکن است ژن‌های تنظمی ناقص ($mecR_1$ و mecI) یا جهش یافته باشند که منجر به سرکوب بیان ژن mecA شوند. همچنین کاست SCCmecA چندین ناحیه IS را از قبیل IS1272 و IS431 در داخل خود حمل می‌کند (۱۱، ۱۲، ۲۵-۲۷). هر دوی این نواحی IS می‌توانند باعث از بین رفتن دو ناحیه انتهای $mecR_1$ و mecI شوند که این امر سبب دو باره سرکوب شدن ژن mecA می‌شوند (۲۸). همین امر باعث می‌شود که سویه‌های از لحاظ ژنوتیپی دارای ژن mecA باشند ولی از لحاظ فنوتیپی و بیان پروتئین PBP2a سرکوب شده و در نتیجه حساس به دیسک اگزاسیلین بوده است.

کوینگ پینگ و همکارانش در سال ۲۰۱۰، به روش PCR و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس استاندارد CLSI، ۱۱۵ نمونه‌ی بالینی استافیلوکوکوس آرئوس را در یکی بیمارستان‌های آموزشی چین، مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه همه‌ی ایزوله‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و اگزاسیلین، جنتامیسین، اریترومایسین و سیپرفلوکساسین مقاومت بالایی داشتند و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین (۶%) بود و تمامی ایزوله‌ها به وانکومایسین حساس بودند، و میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی خیلی بالا بود. توزیع فراوانی ژن mecA در این تحقیق (۸۰%)۹۲ گزارش شده است (۲۹). این در حالی است که در طی دو مطالعه جداگانه فراوانی ژن mecA در شانگهای و مین‌لند چین در سال ۲۰۰۵ به ترتیب ۵۰/۳درصد و ۸۰/۳درصد گزارش شده است که حکایت از افزایش شیوع MRSA در چین دارد (۲۹). در حالی که یافته‌های ما نشان می‌دهد که سویه‌های MRSA علاوه بر مقاومت کامل به پنی‌سیلین، مقاومت بالایی نسبت به مقاومت چند داروئی دارند که توزیع فراوانی مقاومت در سویه‌های MRSA به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کوتریموکسازول، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین به ترتیب (۸۹/۳%)۵۸، (۸۱/۵%)۵۳ و (۷۶/۹%)۵۰ است.

توزیع فراوانی ژن mecA در این مطالعه (۸۹%)۶۵ است. که با تحقیق کوینگ پینگ از نظر میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق شبیه است و هم‌چنین میزان مقاومت چند داروئی در هر دو مطالعه خیلی بالا است که این میزان در مطالعات ما به (۹۵/۹%)۷۰ می‌رسد، و میزان شیوع ژن mecA هر دو تحقیق تقریباً مشابه است (۲۹). با توجه به میزان شیوع خیلی بالای، مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی، احتمال می‌رود سویه‌های MRSA در مطالعات ما از بیمارستان منشأ گرفته باشد. در یک مطالعه توسط فتح‌الله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۸ در تهران میزان مقاومت چند داروئی ۹۵درصد بوده است (۳۰، ۳۱). اما شیوع MRSA در جامعه ما مشابه یا پایین‌تر از کشورهای اروپایی جنوبی می‌باشد (۳۲). طبق بررسی‌های به عمل آمده، فراوانی سویه‌های MRSA در بیمارستان نمازی شیراز (سال ۱۳۸۱) و دو بیمارستان دیگر در مشهد (سال ۱۳۸۲)، به ترتیب ۴۳درصد و ۵۳/۵درصد گزارش شده است (۳۲، ۳۳). بنابراین در این مطالعه، فراوانی MRSA نسبت به سایر بررسی‌های انجام شده در ایران بیشتر است. افزایش MRSA در این تحقیق نشان‌دهنده این است که میزان شیوع MRSA به طور روز افزون در جامعه‌ی ما در حال افزایش است. تلاش برای کنترل کردن MRSA در جامعه، بدون در نظر گرفتن وسعت مخزن آن، می‌تواند فاجعه‌آمیز باشد. شناسایی نواحی شیوع MRSA در هر کشور می‌تواند به تشخیص بین موارد جدید و شیوع محلی کمک کند. این اطلاعات برای طراحی استراتژی‌های موثر برای محدود کردن مخازن MRSA در جامعه مفید است. به طور خلاصه محل جغرافیایی ثابت کرده است که می‌تواند یک فاکتور ریسک برای نشان دادن عفونت‌های MRSA باشد. نقشه‌های جغرافیایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند برای راهنمایی پزشکان در انتخاب آنتی‌بیوتیک قبل از آن‌که نتایج کشت در دسترس قرار گیرند بکار رود (۱۷). داده‌های به دست آمده از آنتی‌بیوگرام و روش مولکولی PCR از بیماران بستری شده مورد بررسی در این مطالعه، میزان مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی را در بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس نشان می‌دهد. با توجه اینکه ممکن است اکثریت بیماران بستری شده در بخش اورژانس و مراقبت‌های ویژه تحت رژیم‌های آنتی‌بیوتیکی تجربی گوناگونی قرار بگیرند، لذا مستعد ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری می‌باشند. عامل دیگری که می‌تواند در تحلیل نتایج پژوهش موثر باشد، نظارت ضعیف بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها و کمبود روش‌های درمان ضد میکروبی معین در بخش مراقبت‌های ویژه و اورژانس می‌باشد. بنابراین حساسیت و یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها باید تعیین شده و بر اساس نتایج هر بخش، نظارت ویژه و روش خاصی برای درمان ضد میکروبی در آن بخش طرح ریزی شود. به دلیل الگوی حساسیت متفاوت در هر بخش باید آنتی‌بیوتیک‌های موثر در درمان MRSA استفاده شوند، در هر صورت کنترل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها و یا کاهش میزان MRSA، نیازمند یک سیستم نظارت قدرتمند و موثر در سطح هر کشور به صورت مستقل خواهد بود. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره‌اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به نقشه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گذشته و حال خود آگاهی دارند. برخی اوقات اختلاف عمده‌ی در میزان شیوع MRSA در کشور ما با سایر کشورهای جهان وجود

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

دارد. علت تفاوت شیوع MRSA در مطالعه ما، مشابه عللی است که در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد. در واقع منشأ این اختلاف عمده، متفاوت بودن میزان شیوع و خطر انتقال MRSAاز جامعه و بیمارستان است که در مورد خطر انتقال از جامعه این اختلافات در زمینه سطح اقتصادی اجتماعی مردم ساکن در یک منطقه، مصرف تجربی آنتی‌بیوتیک‌ها، خود درمانی آنتی‌بیوتیکی توسط افراد کم درآمد جامعه و مصرف بی‌رویه داروها توسط مردم می‌باشد، در مورد خطر انتقال از بیمارستان میزان کارکنان خدمات بهداشتی ناقل استافیلوکوکوس آرئوس، عدم رعایت مقررات بهداشتی در برخورد با بیماران و در بین کارکنان بیمارستان، عدم مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک می‌توان اشاره کرد. بدین ترتیب نتایج به دست آمده از نقاط دیگر جهان نمی‌تواند به طور موثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان آگاه سازد و بدون شک جهت رسیدن به این اهداف نیاز جدی به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و ژنوتایپینگ مولکولی در کشور ما احساس می‌شود.

References:

1. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins (Basel) 2010; 2 (8): 2177-97.
2. Zhang Y, Cheng S, Ding G, Zhu M, Pan X, and Zhang L. Molecular analysis and antibiotic resistance investigation of Staphylococcus aureus isolates associated with staphylococcal food poisoning and nosocomial infections. African Journal of Biotechnology 2011; 10 (15): 2965-2972.
3. Zamani A, Sadeghian S, Ghaderkhani J, Alikhani MY, Najafimosleh M, Goodarzi MT. Detection of Methicillin-Resistance (mec-A) Gene in Staphylococcus aureus Strains by PCR and Determination of Antibiotic Susceptibility. Annals of Microbiology 2007; 57 (2): 237-276.
4. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother 2002; 49 (5): 793-801.
5. Lowy FD, Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med ۱۹۹۸; ۳۳۹ (۸): ۳۲-۵۲۰.
6. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (3): 222-35.
7. Berger-Bachi B, Genetic basis of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Cell Mol Life Sci ۱۹۹۹; ۵۶ (۱۰-۹): 764-70.
8. Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, farshad S. Distribution Patterns of Methicillin Resistance Genes mecA Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Specimens. IBJ 2000; 4 (8): 173-178.
9. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, and Galvez A. Multiple Roles of Staphylococcus aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. Toxins (Basel) 2010; 2 (8): 2117-31.
10. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and c linical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10 (4): 781-91.
11. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant Staphylococcus haemolyticus. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (7): 1955-63.
12. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34(4): 482-92.
13. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46 (7): 2155-61.

14. Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (10): 3457-9.
15. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43 (6): 1449-58.
16. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, and Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 2001; 9 (10): 486-93.
17. Tirabassi MV, Wadie G, Moriarty KP, Garb J, Konefal SH, Courtney R A, et al. Geographic information system localization of community-acquired MRSA soft tissue abscesses. J Pediatr Surg 2005; 40 (6): 962-6.
18. Shanmugam S, Selvarajan R, and Thangiah S. Drug Resistance of Staphylococcus aureus in Sinusitis Patients. International Journal of Biosciences 2011; 1 (3): 63-71.
19. Fouladi AAI, Choupani A, and FallahMehrabadi J. Study of prevalence of Enterotoxin type B gene in Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from wound. Kowsar Medical Journal 2011; 1 (16): 21-25. Persian
20. Hosainzadegan H, Menati Sh, Tarrahi MJ, Mohammadi F. Screening of Methicillin and Vancomycin resistant Staphylococcus aureus in the nasal of hospital p ersonnel of Khorram Abad ,Iran. Medical laboratory Journal 2008; 2 (1): 26-32. Persian
21. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (11): 7687-92.
22. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among Staphylococcus aureus isolates from various sites of infection. Infect Immun 2001; 69 (1): 345-52.
23. Kanafani Z A, Fowler VG. [Staphylococcus aureus infections: new challenges from an old pathogen]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24 (3): 182-93.
24. Kim JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Choi MS, et al. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of Staphylococcus aureus, their staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) subtype classification, and their toxin gene profiles. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56 (3): 289-95.
25. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45 (5): 1323-36.
26. Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, et al. Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (3): 837-45.
27. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of diverse genetic backgrounds. J Infect Dis 2002; 186 (9): 1344-7.
28. Thong K L, Junnie J, Liew, FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibiograms and molecular subtypes of methicillin-resistant Staphylococcus

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

aureus in local teaching hospital, Malaysia. J Microbiol Biotechnol 2009; 19 (10): 1265-70.

29. Qing P, Bing H, Shuqin Z, Yuanchun H, Dexing H, Fen Y, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in a teaching hospital, Shantou, China. African Journal of Microbiology Research 2010; 4 (9): 844-848.
30. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008; 14 (3): 217-20.
31. Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Asian countries. J Clin Microbiol 2005; 43 (1): 421-6.
32. Naderinasab M,Tavakol Afshari J, Nazem M, Fatehmanesh P, Faramarzi H, Khodadost MA. Determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus via phenotypic methods. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2005; 87 (48): 7-16. Persian
33. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modification DNA extraction for rapid PCR detection of methicillin-resistant Staphylococci. Iranian Biomed J 2004; 8 (3): 161-165.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]

Original Article

PREVALENCE OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY DISK DIFFUSION AND MOLECULAR METHODS IN ICU AND EMERGENCY SECTIONS IN ONE OF EDUCATIONAL HOSPITAL, TEHRAN

Shafie Ghorbani Tazhandare[1], Abbas Ali Imani Fooladi[2], Mohammad Reza Nourani[3]

Received: 02 Dec, 2012; Accepted: 19 Feb, 2013

Abstract

***Background*:** Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MSRA) is one of the main causes of serious infections in Iran and other countries. Treatment of these infections has become more difficult because of resistance to most antibiotics. The aim of this study was to determine the incidence of methicillin-resistance gene in S. aureus isolates and antibiotic susceptibility to oxacillin and other antibiotics were performed by Disc Diffusion Agar (DDA).

***Materials and Methods*:** This study was carried out on SA isolates (n=73) collected from the clinical samples at during 2011 in ICU and Emeregency sections. All S. aureus isolates was identified after performing by routine laboratory procedures including, Gram stain, catalase test, DNase production, coagulase activity and mannitol salt fermentation. In this study used to identify Phenotypic by Disc Diffusion Agar (DDA) and for identify genotypic two pairs of primers designed by AlleleID software (version 6) on the basis of published DNA sequences of the S. aureus gene. Synthesis of primers was carry out by Cinnagen Company, Iran. PCR reaction of mecA with designed primers was optimized and incident of mecA was studied in clinical samples in ICU and Emergency sections.

***Results*:** The PCR analysis of 73 S. aureus isolates originated from patients for mecA showed 65 (89%) cases were positive. But only 54 (74%) isolates were methicillin resistant when we used the DDA method.

***Conclusion*:** As a conclusion, the resistance to methicillin of S. aureus in Baqiyatallah hospitals has reached to 89% and more than 95% of them were multidrug resistance.

***Key words*:** Staphylococcus aureus, antibiotic resistant, Methicillin, MRSA.

***Address**:* Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
***Email**:* imanifouladi.a@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(2): 120 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc in Microbiology, Microbiology Department, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran*
[2] *Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Associate Professor, Chemical Injury Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2025-03-20]