مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۸)

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ونکومایسین جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های سطح کلان شهر تهران

نیما اسلام‌نژاد[۱]، فرشته قندهاری[۱*]، محسن میرزایی[۲]، محبوبه مدنی[۱]، محمدرضا مهرابی[۲]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران،[۲] گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: امروزه یکی از مهم‌ترین چالش‌ها، گسترش سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ونکومایسین است. اکتساب مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تغییرات الگوهای بیماری‌زایی استافیلوکوکی از مهم‌ترین عوامل حدت به شمار می‌آید. لذا هدف از این مطالعه تعیین و شناسایی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ونکومایسین جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های سطح کلان شهر تهران بود.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی ـ توصیفی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۵۰۲ نمونه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تکثیر ژن *16s_rRNA* با روش PCR شناسایی و تأیید شدند. تمامی جدایه‌ها از نظر مقاومت به متی‌سیلین با روش دیسک‌گذاری و از نظر مقاومت به ونکومایسین، با استفاده از روش حداقل غلظت مهار کنندگی بررسی و در نهایت هر دو گروه از نظر مولکولی مورد آزمون قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری بر اساس تحلیل واریانس یک طرفه و ضریب خطا کمتر از ۰/۰۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۵۰۲ جدایه، ۱۶۸جدایه مقاوم به متی سیلین(۳۳/۴۶ درصد)، ۶ جدایه مقاوم به ونکومایسین (۱/۱۹ درصد) و ۲ جدایه دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین(۰/۳۹ درصد) بودند، فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین ۹۸/۸ درصد ، فراوانی ژن *vanB* و *vanC1*هر کدام ۳۷/۵ درصد و فراوانی ژن *vanC3* ۱۲/۵ درصد در جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین بود. بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های مقاوم به متی سیلین از محل کاتتر و بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین و دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین از محل ترشحات جداسازی شده بودند. در هر دو گروه بیشترین مقاومت مربوط به بزرگسالان بود.

نتیجه‌گیری: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و ونکومایسین تهدید جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شوند. شناسایی صحیح الگوی مقاومتی عفونت ایجاد شده و استفاده از آنتی‌بیوتیک مناسب می‌تواند سرعت مقاومت روز افزون این باکتری را کندتر کند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین، ژن *mecA* ، ژن *van*

***نویسنده مسئول: فرشته قندهاری، اصفهان،** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی

Email: fe_gh_2010@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. زیستگاه طبیعی این باکتری بیماری‌زای فرصت طلب اپی‌تلیوم سنگ‌فرشی مجرای قدامی بینی می‌باشد. تقریباً به طور ثابت در ۲۰ درصد جمعیت کلونیزه شده و به طور متناوب در ۵۰ درصد جمعیت نیز شناسایی شده است(۱). اولین مرحله در بیماری‌زایی عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* کلونیزاسیون است. افراد کلونیزه بدون علامت، می‌توانند از طریق تماس پوستی و یا تماس با شی آلوده، منبعی برای گسترش انسان به انسان بیماری باشند(۲). این کوکسی گرم مثبت و کوگولاز مثبت، از خانواده استافیلوکوکاسه، از فاکتورهای مهم در عفونت‌های فرصت‌طلب پوستی و بافت‌های نرم و همچنین باکتریمی می‌باشد که به صورت اکتسابی از طریق بیمارستان یا جامعه به دست می‌آیند(٤ و٣). تظاهرات بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار متغیر است. از جمله عفونت‌های در ارتباط با این باکتری می‌توان به باکتریمی، سپتی سمی، پنومونی، استئومیلیت و عفونت پوست اشاره کرد(۵).

در حال حاضر گسترش سویه مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* (MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین *استافیلوکوکوس اورئوس* (VRSA: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) و هم‌چنین پیدایش باکتری‌های مقاوم چند دارویی، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی و دارویی، که عمده‌ترین آنها آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام هم‌چون پنی‌سیلین، متی‌سیلین، اگزاسیلین، نافی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها می‌باشند، به یکی از اصلی‌ترین چالش‌های درمانی تبدیل شده است(٦). متی‌سیلین یک آنتی‌بیوتیک نیمه صناعی است و از خانواده پنی‌سیلین‌ها است که نخستین بار در سال ۱۹٦۰ جهت درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به پنی‌سیلین استفاده شد که نسبت به آنزیم پنی‌سلیناز مقاوم است، اما تنها یک سال بعد، در سال ۱۹٦۱ نخستین سویه مقاوم به متی‌سیلین گزارش شد و به سرعت در سراسر جهان منتشر شد(۸ و۷). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های MRSA دارای قطعه کروموزومی تحت عنوان Sccmec هستند که حاوی ژن(*mecA*) یا همان ژن مقاومت به متی سیلین می‌باشند. این ژن پروتئینی تحت عنوان پنی سیلین باندینگ پروتئین تولید می کند، که تمایل کمی برای اتصال به داروهای بتالاکتام دارد و عملکرد متی‌سیلین‌ها را مختل می‌نماید، تا کنون ۷ تیپ مختلف از Sccmec شناسایی شده است. خطرناک‌ترین آنها تیپ۳ می باشد که علاوه بر ژن مقاومت به متی‌سیلین حامل ژن‌های مقاومت به اریترومایسین، استرپتومایسین، کادمیوم و جیوه نیز است(۱۱ـ۹). ونکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی

باکتری‌های گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند. ونکومایسین مهم‌ترین داروی انتخابی درمان عفونت ناشی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقام به متی‌سیلین می‌باشد. بنابراین وجود سویه‌های مقاوم به ونکومایسین هشداری جدی برای جامعه پزشکی و درمان است(۸). سویه‌های مقاوم به ونکومایسین اولین بار در ژاپن تحت عنوان سویه‌های هتروژن *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت حد واسط به ونکومایسین یا hVISA: heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* گزارش شدند و پس از استفاده از ونکومایسین و برخورد با آن، به انواع مقاوم تبدیل شدند. سویه‌های مقاوم به ونکومایسین دارای سرعت رشد کمتر و دیواره‌ی سلولی ضخیم‌تری نسبت به سویه‌های حساس هستند(۱۲). لذا هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران بستری شده در برخی از بیمارستان سطح کلان شهر تهران در طول سال ۱۳۹۷ بود.

روش بررسی

این یک مطالعه توصیفی- مقطعی می‌باشد، از شهریور سال۱۳۹۷ تا اسفند سال ۱۳۹۷ به وسیله تکنسین با استفاده از سوآپ از قسمت‌های مختلف از جمله آبسه‌های عفونی، زخم‌های بستری و سوختگی، مری، ترشحات عفونی، برونش، کاتاتر و غیره از ۱۳۹۳ بیمار نمونه‌برداری شد، از آن جایی که متغیر مورد بررسی کمی است، برای تعیین حجم نمونه از فرمول $n = Z^2 1-\alpha/2\ P(1-P)/d^2$ استفاده شد. طبق بررسی‌های آماری برای سطح اطمینان ۹۵ درصد مقدار z1-α حداکثر ۱/۹۶ می‌باشد. خطای قابل قبول برای تخمین شیوع(d)۱ درصد در نظر گرفته شد. با توجه به پژوهش‌های قبلی بهترین احتمال برای شیوع(p) استافیلوکوکوس‌های مقاوم حد واسط به طور میانگین ۳/۶ درصد در نظر گرفته شد(۱۳).

.برای تعیین هویت باکتری‌ها از روش استاندارد میکروب‌شناسی رنگ‌آمیزی گرم، بررسی کاتالاز، آزمایش اکسیداز، کواگولاز، دی ان ایز ، رشد در محیط مانیتول سالت آگار و اوره آز استفاده شد. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت داده شده در محیط تریپتیک سوی براث به آزمایشگاه پژوهشی میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد انتقال داده شد. سپس این باکتری‌ها را در محیط برین هارت اینفیوژن براث حاوی ۲۰ درصد گلیسرول تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سلسیوس فریز شدند. هم‌چنین، جهت تعیین هویت مولکولی حضور ژن 16S_rRNA بررسی شد.

جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به صورت فنوتیپی به روش انتشار از دیسک با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک‌های سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم تهیه شده از شرکت پادتن طب طبق دستورالعمل

انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute) شناسایی شدند.

برای انجام دیسک دیفیوژن سوسپانسیون باکتری باغلظت نیم مک فارلند تهیه شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیک بر روی آن قرار داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش مخصوص اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای کنترل دیسک‌ها نیز از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۹۲۱۳ به عنوان کنترل منفی حساسیت به متی سیلین و از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۳۳۵۹۲ به عنوان کنترل مثبت و سویه مقاوم به متی سیلین استفاده شد(٦ و ۱۰). طبق استاندارد CLSI هاله بزرگتر یا مساوی با ۲۲ میلی‌متر حساس و هاله کمتر یا مساوی ۲۱ میلی‌متر به عنوان مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد. به دلیل مقاومت ناهمگن در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از روش مولکولی با استفاده از توالی *rRNA_۱٦S* جهت تأیید شناسایی ایزوله‌ها استفاده شد. تشخیص MRSA در جدایه‌های مورد بررسی با نتیجه مثبت در روش‌های بالا با استفاده از روش PCR و حضور ژن *mecA* تأیید شد.

جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین به صورت فنوتیپی با استفاده از روش MIC و با استفاده از پلیت ۹٦ خانه و پودر آنتی‌بیوتیک شرکت داروسازی اکسیر طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی(CLSI) شناسایی شدند. تشخیص VRSA در جدایه های مورد بررسی با نتیجه مثبت در روش‌های بالا به استفاده از روش PCR و بررسی حضور ژن *van* تأیید شدند.

برای بررسی کمترین میزان غلظت آنتی‌بیوتیکی جهت مهار رشد باکتریایی از روش اندازه‌گیری حداقل غلظت مهار کنندگی یا به اختصار MIC به روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. بر طبق استاندارد CLSI شناسایی سویه مقاومت حد واسط *استافیلوکوکوکی* با روش دیسک‌گذاری قابل تشخیص نمی‌باشد(۱٤). بنابراین، روش تست MIC برای جداسازی نمونه‌ها با مقاومت حد واسط و همچنین مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین انجام شد. ابتدا باید به محاسبه پتنسی آنتی‌بوتیک و غلظت آن پرداخته شد. طبق استاندارد CLSI سویه‌هایی که در برابر یا بیشتر از غلظت ۱٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بین نروند سویه‌های مقاوم، نامیده می‌شوند. از طرفی سویه‌هایی که در غلظتی بین ٤ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بین نروند دارای مقاومت حد واسط و سویه‌هایی که در غلظت‌های برابر یا کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از بین بروند حساس تلقی می شوند(۱۷– ۱۵).

ابتدا از کلنی سویه‌های مورد نظر که بر روی محیط کشت بلاد آگار به مدت ۲٤ ساعت انکوبه و رشد کرده بودند، به وسیله لوپ برداشته و به داخل

سرم فیزیولوژی منتقل و حل گردید. کدورت این محلول باید برابر با نیم مک فارلند باشد، سپس در زیر هود به چاهک‌های ۷ ستون اول و دو ستون آخر یعنی ستون ۱۱ و ۱۲ میکروپلیت ۹۶ خانه به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید. در مرحله بعد از محلول آنتی‌بیوتیک به خانه‌های ستون اول ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و پس از این که به خوبی مخلوط شد، ۱۰۰ میکرولیتر از ستون اول برداشته و به ستون دوم اضافه شد، پس از مخلوط شدن مجددا ۱۰۰ میکرولیتر به خانه سوم اضافه گردید و این روند را تا ستون هفتم انجام شد، در انتها ۱۰۰ میکرو لیتر از ستون هفتم دور ریخته شد. به خانه ۱۱ نیز که به عنوان کنترل منفی آزمون است نیز آنتی‌بیوتیک اضافه شد. سپس، از سوسپانسیون باکتری که معادل با نیم مک فارلند تهیه شد، ۲۰ میکرولیتر برداشته و به ۱۴۸۰ لاندا سرم فیزیولوژی اضافه شد، سپس از آن به مقدار ۵۰ میکرولیتر معادل با $۱۰^{۵}\times ۱$ باکتری به همه خانه‌ها(به جز خانه شماره ۱۱) اضافه شد. به خانه‌های ستون ۱۲ نیز که به عنوان کنترل مثبت می‌باشد، از سوسپانسیون باکتری اضافه گردید، در نهایت دور پلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴–۱۸ ساعت انکوبه گردید. پس از زمان انکوباسیون با استفاده دستگاه الایزا کدورت سنجی شد و برای تأییدیه نتایج از رنگ تترازولیوم کلراید استفاده شد و نتیجه MIC بررسی گردید. خانه‌هایی که تغییر رنگ مایل به طوسی، بنفش داشتند، دارای علایم از حیات و زنده ماندن باکتری داشتند. در نهایت سویه‌های منتخب مجدداً تست شد و تکرارپذیری نتایج بررسی شد(۱۹ و ۱۸). جهت بررسی و کنترل کیفی از سویه *انتروکوکوس فکالیس* ATCC۵۲۱۹۲ به عنوان عامل کنترلی و مقاوم به ونکومایسین و از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۹۲۱۳ به عنوان عامل کنترلی و سویه حساس استفاده گردید (۲۰). طبق استاندارد CLSI، حداقل غلظت مهارکنندگی سویه‌های مقاوم *انتروکوکوس فکالیس* به آنتی بیوتیک ونکومایسین غلظتی بزرگتر و یا مساوی ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

ابتدا نمونه‌ها بر روی محیط بلادآگار پاساژ داده شد، سپس یک کلنی از محیط را برداشته و در محیط BHI براث درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌متری کشت داده و به مدت ۲۰–۱۸ ساعت انکوبه گردید و سپس استخراج DNA را طبق پروتکل تهیه شده، از کیت سینا کلون انجام داده شد. سپس برای بررسی و تعیین غلظت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر اپندورف استفاده شد. پرایمرها از شرکت متابیوم آلمان تهیه شدند، توالی اولیگو نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است(۲۵—۲۱). جدایه‌های منتخب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR در دستگاه ترموسایکلر(BIORAD) بررسی و تعیین هویت شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی واکنش PCR برای ژن *16s rRNA* شامل؛ واسرشت اولیه در

دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل حرارتی شامل؛ واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به DNA الگو ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو یا تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه و در پایان دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. ردیابی محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد با الکتروفورز با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ژل به وسیله رنگ Safe stain رنگ‌آمیزی شد سپس ژل را در زیر تابش اشعه UV در دستگاه ترنسلومیناتور مشاهده شد. سویه‌های کنترل مثبت واجد ژن‌های مورد بررسی ۳۳۵۹۲ ATCC و ATCC۵۲۱۹۹ از بخش مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شدند، هم‌چنین از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد(۲۱و۲۰).

در نهایت جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* به روش PCR و جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین و یا دارای مقاومت حد واسط با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *van* به روش PCR مولتی پلکس یا چندگانه در دستگاه ترموسایکلر(BIORAD) بررسی شدند(جدول ۱). واکنش PCR برای پرایمرهای اختصاصی ژن *mecA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی این واکنش شامل؛ واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل؛ واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر به DNA الگو ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و طویل شدن رشته الگو یا تکثیر در ۷۴ درجه سلسیوس به مدت ۷۵ ثانیه و در پایان دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت، هم‌چنین واکنش PCR مولتی پلکس برای پرایمرهای اختصاصی ژن *van* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی این واکنش شامل؛ واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳۶ سیکل حرارتی شامل؛ واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر به DNA الگو ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن رشته الگو یا تکثیر در ۷۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در پایان دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. ردیابی محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد با الکتروفورز با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت(۲۲-۲۶). سویه‌های کنترل مثبت واجد ژن‌های مورد بررسی ۳۳۵۹۲ ATCC و ATCC۵۲۱۹۹ از بخش مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شدند. هم‌چنین از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد(۲۰).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار اکسل و آزمون‌های آنوا و بر اساس تحلیل واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شد.

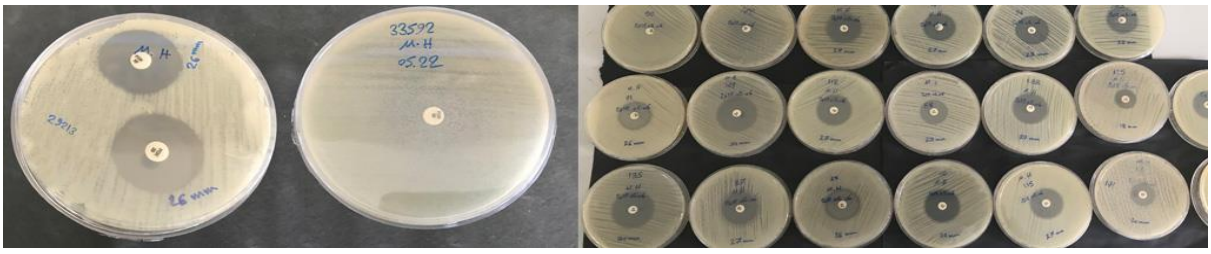
جدول ۱: پرایمر و دمای آنلینگ ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه

ژن	پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول	رفرنس
16s_rRNA	5′-GGGACCCGCACAAGCGGTGG-3′ 5′-GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA-3′	٦٠	١٩١	(٢١)
mecA	5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATGA-3′ 5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3′	٥٥	٣١٠	(٢٢)
vanA	5′-GTACAATGCGGCCGTTA-3′ 5′-GGGAAAACGACAATTGC-3′	٥٤	٧٣٢	(٢٣)
vanB	5′-CCGACAATCAAATCATCCTC-3′ 5′-AAGCTATDCAAGAAGCCATG-3′	٥٤	٥٣٦	(٢٤)
vanC١	5′-ATCGCATCACAAGGACCAATC-3′ 5′-GAAAGACAACAGGAAGACCGC-3′	٥٤	٧٩٦	
vanC٢	5′-CGCAGGGACGGTGATTTT-3′ 5′-CGGGGAAGATGGCAGTAT-3′	٥٤	٤٨٤	(٢٥)
vanC٣	5′-GCTTGTTCTTTGACCTTA-3′ 5′-GCCTTTACTTATTGTTCC-3′	٥٤	٢٢٤	

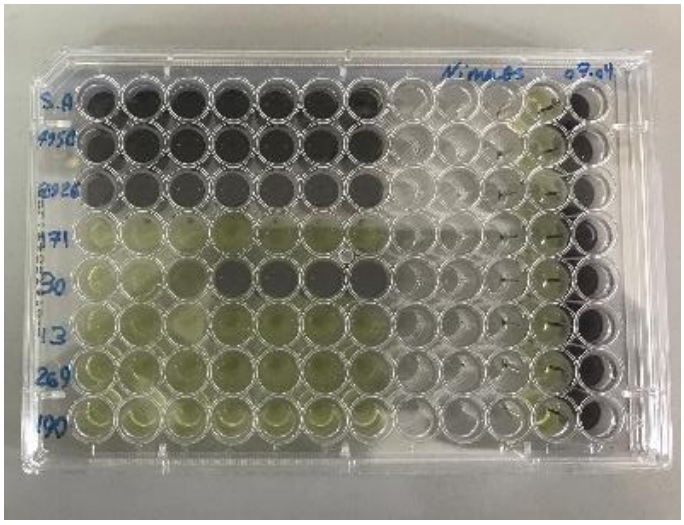
یافته‌ها

تعداد ۵۰۲ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* غیر تکراری از بیمارستان‌های لقمان، حکیم، ابن‌سینا، خاتم، میلاد و جم در سطح کلان شهر تهران، طی مدت ٦ ماه جمع‌آوری و شناسایی شد. بر اساس تست دیسک دیفیوژن در مجموع ۵۰۲ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی ١٦٨ جدایه(٣٣/٤٦ درصد) به عنوان MRSA تشخیص داده شدند. این جدایه‌ها روی محیط حاوی دیسک سفوکسیتین دارای هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۲۱ میلی‌متر بودند که بر اساس CLSI به عنوان مقاوم تشخیص داده شدند(شکل ۱). درصد فراوانی هرکدام از نمونه‌ها بر اساس محل جداسازی عفونت و سن بیمار در نمودار ۱ و ۲ آورده شده است. بالاترین میزان مقاومت مربوط به نمونه‌های جداسازی شده از کاتتر و کمترین مرتبط با نمونه‌های جداسازی شده از مری و عفونت‌های پوستی بود. در نمونه‌های جداسازی شده از عفونت استخوان نیز هیچ مقاومتی مشاهده نشد. در ارتباط عامل متغیر سن نتایج نشان داد که در سنین بالاتر در صد مقاومت روند افزایشی دارد. در تست میکرو دایلوشن براث برای ٤٩٤ (٩٨/٤ درصد) جدایه مقدار MIC= ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، برای ۲ جدایه (۰/۳۹ درصد) مقدار MIC=۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای ٦ جدایه(۱/۱۹ درصد) مقدار MIC=۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید. که بر این اساس در مجموع ٦ جدایه (۱/۱۹ درصد) به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین و ۲ جدایه(۰/۳۹ درصد) به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین و باقی نمونه‌ها به عنوان سویه حساس با ٩٨/٤ درصد در تست میکرودایلوشن براث تشخیص داده شدند(شکل ۲). درصد فراوانی هرکدام از نمونه‌ها بر اساس محل جداسازی عفونت و سن بیمار در نمودار ۳ و ٤ آورده شده است. بالاترین میزان مقاومت

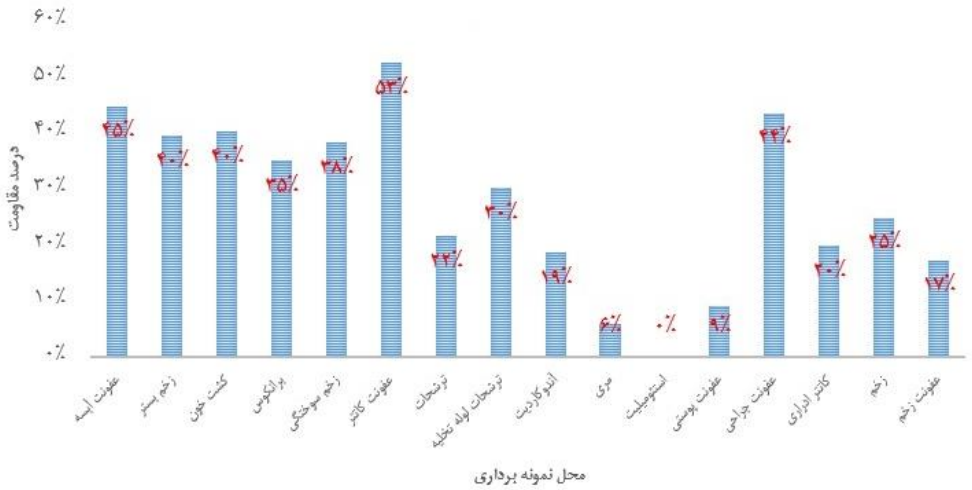
استافیلوکوس اورئوس های مقاوم به ونکومایسین مربوط به نمونه‌های جداسازی شده از ترشحات و سویه‌های مقاوم دیگر مرتبط با نمونه‌های جداسازی شده از عفونت آبسه، زخم بستر و عفونت‌های جراحی بود. هم‌چنین مقاومت سویه‌های *استافیلوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط مرتبط با سویه‌های نمونه‌برداری شده از زخم و برونش بود. در سایر نمونه‌های جداسازی شده نیز هیچ مقاومتی مشاهده نشد. در ارتباط عامل متغیر سن نتایج نشان داد که در سنین مختلف در صد مقاومت متفاوت می‌باشد، هیچ ارتباط معنی‌داری بین سن با فراوانی سویه‌های *استافیلوکوس اورئوس*های مقاوم به ونکومایسین وجود ندارد، در نهایت طبق بررسی نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی صورت پذیرفته، از ٦ جدایه مقاوم به ونکومایسین، ۳ جدایه دارای مقاومت به متی‌سیلین نیز هستند، هم‌چنین هیچ کدام از جدایه‌ها با مقاومت حد واسط، دارای مقاومت به متی سیلین نبودند. برای ١٦٨ جدایه مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و هم‌چنین با مقاومت حد واسط حضور توالی ژن *16S_rRNA* بررسی گردید که نتایج فراوانی ۱۰۰ درصدی حضور ژن *16S_rRNA* را تأیید می‌کند(شکل ۳). برای ١٦٨ جدایه مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و هم‌چنین با مقاومت حد واسط حضور توالی ژن *mecA* بررسی گردید که فروانی در بین تمام جدایه ۹۸/۸٤ درصد بود(شکل ٤). در بین ١٦٨ سویه مقاوم به متی سیلین تنها در ۲ جدایه توالی ژن *mecA* مشاهده نشد(۹۸/۸۰ درصد) که یکی از نمونه‌ها از جدایه‌هایی بود که به ونکومایسین نیز مقاومت داشت. باقی جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین و یا دارای مقاومت حد واسط دارای توالی ژن *mecA* بودند. برای ٦ جدایه مقاوم به ونکومایسین و هم‌چنین ۲ جدایه با مقاومت حد واسط، حضور ژن مقاومتی *van* بررسی گردید که نتایج حضور ۳۷/۵ درصدی برای ژن‌های *vanB* و *vanC*۱ و ۱۲/۵ درصدی برای *vanC*۳ را نشان می‌دهد(شکل ۵).



شکل ۱: تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برای دیسک سفوکسیتین به همراه نمونه‌های کنترل مثبت(*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33592) و کنترل منفی(*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213)

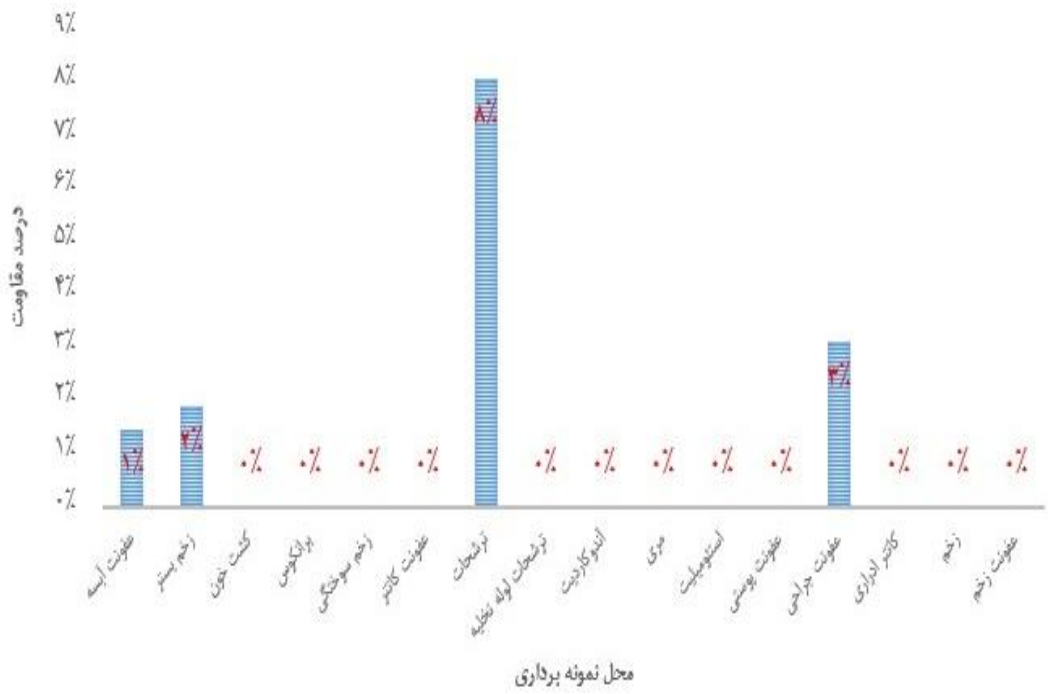


شکل ۲: تست میکرودایلوشن جهت تععین MIC جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

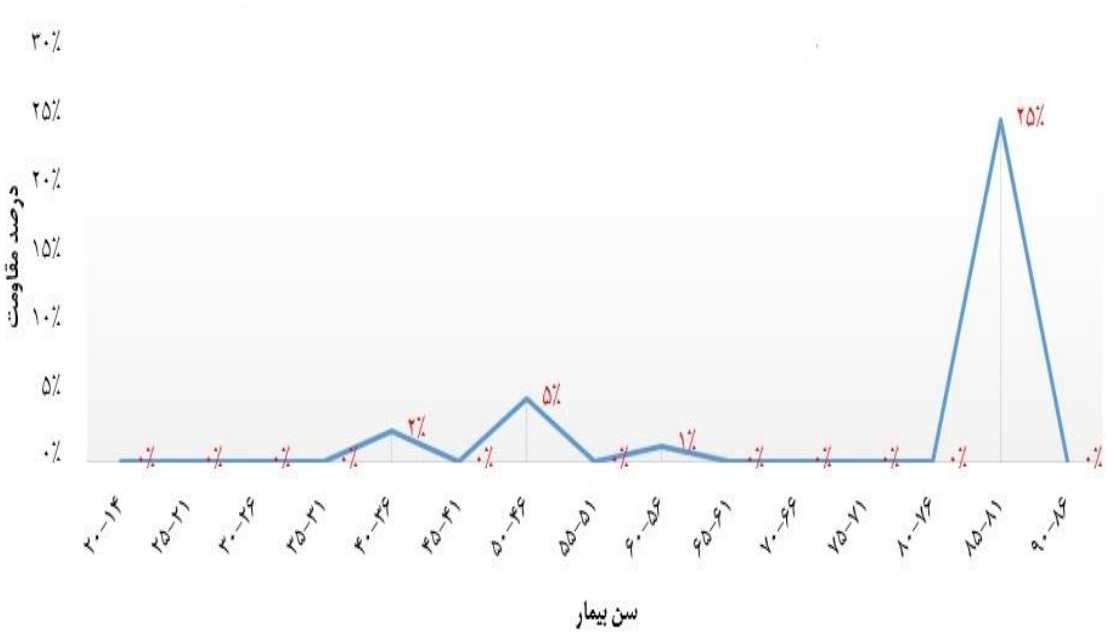


نمودار۱ : درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین بر اساس محل جداسازی نمونه

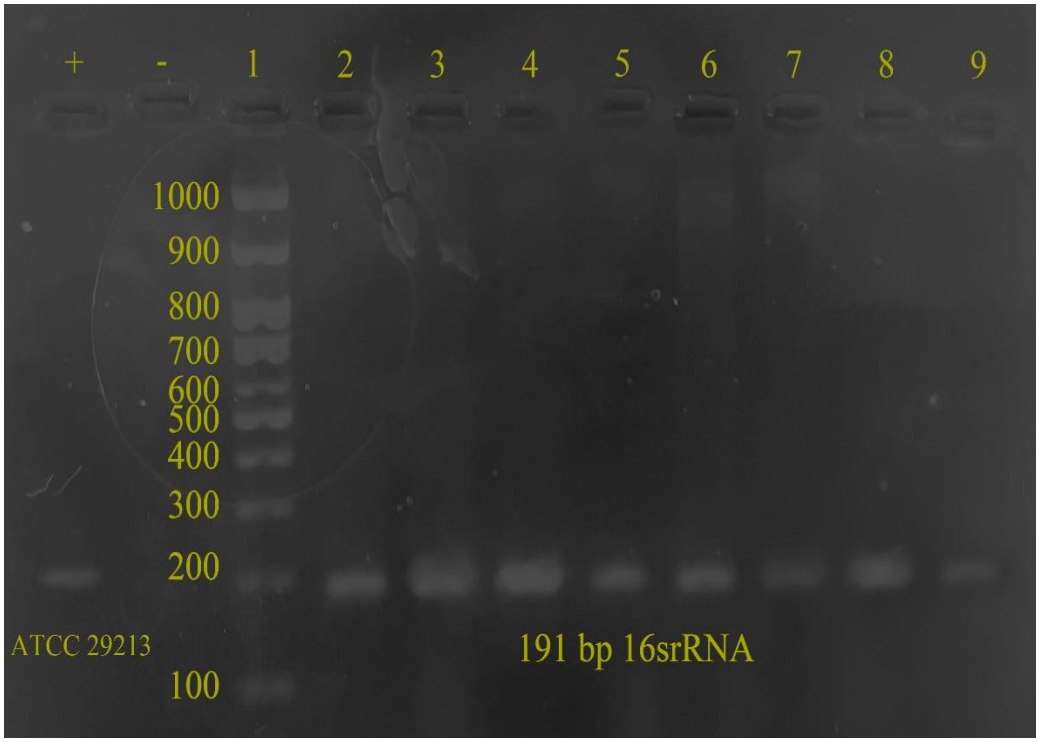
نمودار ۲: درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین بر اساس سن بیمار



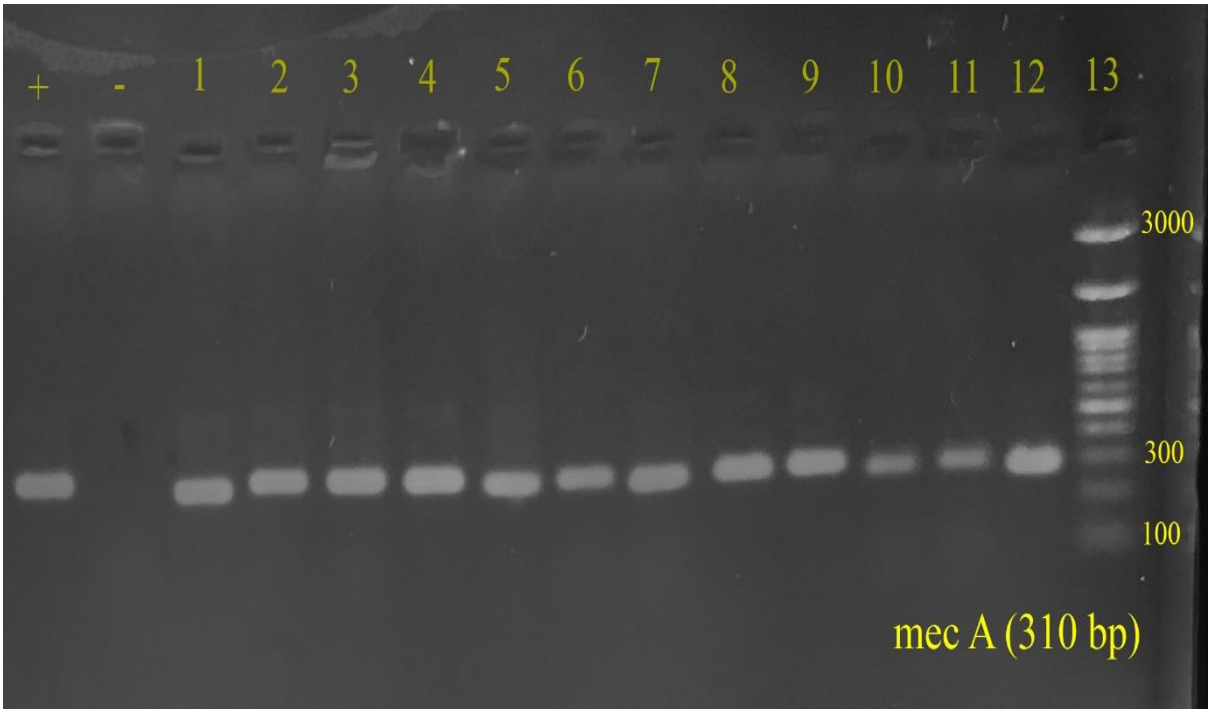
نمودار ۳: درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بر اساس محل جداسازی نمونه



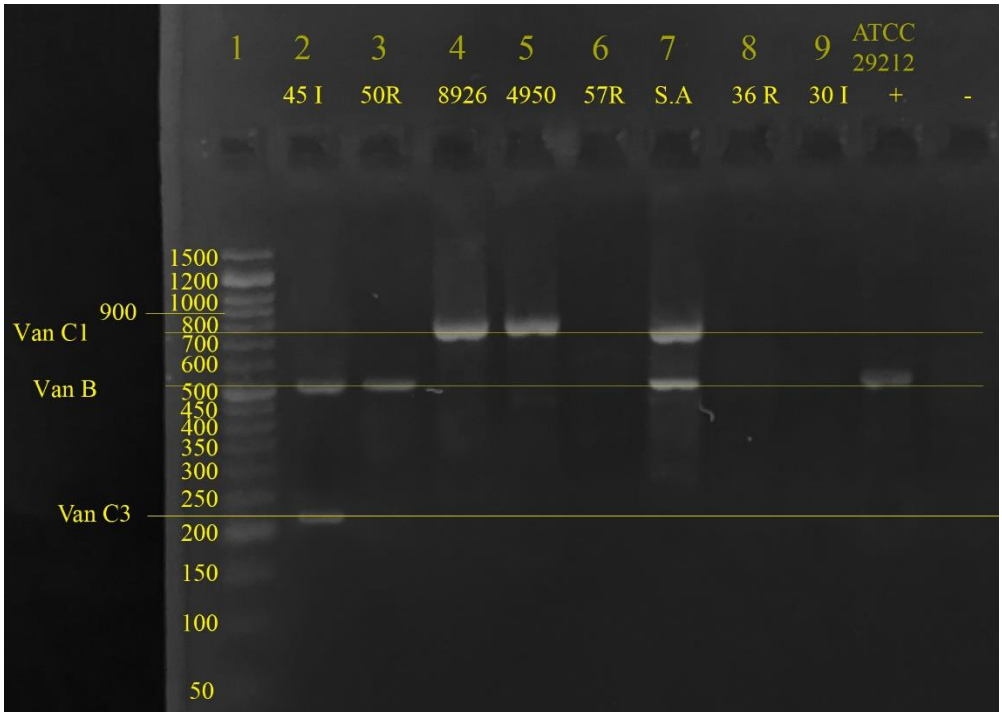
نمودار ٤: درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بر اساس سن بیمار



شکل ۳: تصویر الکتروفورز مربوط به توالی اختصاصی *16s rRNA*، **کنترل مثبت** *S. aurues* ATCC29213، **آب مقطر به عنوان کنترل منفی، چاهک شماره ۱ لدر** bp ۱۰۰۰–۱۰۰، **چاهک ۲تا ۹ نمونه‌های دارای ژن** *16s rRNA*



شکل ٤: تصویر الکتروفورز مربوط به ژن mecA، **کنترل مثبت** *S. aurues* ATCC 33591، **آب مقطر به عنوان کنترل منفی، چاهک شماره ۱۳ لدر** bp ۳۰۰۰–۱۰۰، **چاهک ۱تا ۱۲ نمونه‌های دارای ژن** mecA



شکل ۵: تصویر الکتروفورز مربوط به ژن های مقاومت آنتی‌بیوتیکی van، **کنترل مثبت** *E. faecalis* ATCC 52199، **آب مقطر به عنوان کنترل منفی ، چاهک شماره ۱ لدر** ۱۵۰۰bp–۵۰، **چاهک۲، ۳ و۷ نمونه‌های دارای ژن** *van* B، **چاهک٤، ۵ و۷ نمونه‌های دارای ژن** *vanC1*، **چاهک۲ نمونه دارای ژن** *vanC3*

بحث

امروزه وجود سویه‌های استافیلوکوکی بیماری‌زا و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار، باعث شده که محققین به شناخت بیشتر و تولید آنتی‌بیوتیک‌های بهتر گرایش یابند. این تکمیل شناخت در گرو انجام پژوهش‌های ساختاری و مولکولی بیشتر بر مکانیسم‌های مقاومتی باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف صورت می‌پذیرد. مقاومت روز افزون *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر داروهای ضد باکتریایی، به صورت یکی از نگرانی‌های اصلی صاحب‌نظران عرصه سلامت درآمده است. بدین صورت که با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید، سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته‌اند و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده‌اند. از این رو بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار حایز اهمیت بوده و در جلوگیری و کنترل گسترش سویه‌های مقاوم این باکتری نقش مهمی دارد. بررسی موید آن است که باید پژوهش‌های مستمر برای کنترل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده، به خصوص در بیمارستان‌ها انجام شود و از تجویز غیر ضروری آنتی‌بیوتیک‌ها به طور جدی اجتناب گردد، چرا که در غیر این صورت مقاومت این میکروارگانیسم نسبت به داروها، روند صعودی خواهد داشت که ممکن است با نتایج جبران

ناپذیری همراه شود(۲۷). لذا هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران بستری شده در برخی از بیمارستان سطح کلان شهر تهران در طول سال ۱۳۹۷ بود.

یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی، عفونت استافیلوکوکی می‌باشد، متداول‌ترین جایگاه *استافیلوکوکوس اورئوس* به لحاظ اکولوژیکی بینی انسان است و انتقال این باکتری از این راه باعث افزایش این نوع عفونت در زمان بستری شدن در بیمارستان می‌شود، چرا که بیماران اغلب با کاهش قدرت سیستم ایمنی مواجه می شوند و فرصت برای این عفونت فرصت طلب مهیا می‌گردد(۲۸). در سه دهه گذشته به علت افزایش شیوع مقاومت به متی‌سیلین نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده از آنتی‌بیوتیک وانکوماسین به طور چشمگیری افزایش یافته است. در بسیاری از موارد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نیز نسبت به ونکومایسین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین هتروژنوس، حساسیت آنها کاهش یافته که این در نتیجه عدم توانمندی عملکرد ونکومایسین در مقابله با این عفونت حاد و مزمن می‌باشد(۲۹). از طرفی پژوهش‌های محدودی در خصوص میزان شیوع و ویژگی‌های مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین در ایران انجام پذیرفته است، در صورتی که در سایر کشورها پژوهش‌های متعددی روی میزان شیوع و ژنتیک این سویه‌ها انجام گشته که نتیجه آن‌ها قابل مقایسه و بررسی می‌باشد، پژوهش‌هایی که تفاوت‌های موجود از نظر شیوع و ژنتیک مقاومت نسبت به ونکومایسین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارستان ها، شهرها و به خصوص کشورهای مختلف را کاملاً بررسی می‌کنند(۳۱ و ۳۰). با توجه به نتایج پژوهش‌های قبلی برای تشخیص سویه‌های مقاوم و دارای مقاومت حد واسط در روش‌های شناسایی آزمایشگاهی محدودیت‌هایی وجود دارد که کمتر مورد بحث قرار گرفته است. مثلاً روش دیسک آگار دیفیوژن می‌تواند در انتشار ضعیف آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی دارای خطا باشد، لذا توصیه شده برای این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها از روش‌های جایگزین با دقت بالاتر همچون MIC استفاده شود. روش‌های دیگری از قبیل؛ E-test به طور مؤثر در تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین هتروژنوس و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین استفاده می‌گردد(۳۲).

در مطالعه حاضر برای ۵۰۲ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تست حساسیت آنتی‌بیوتیک

MIC و تست دیسک دیفیوژن انجام شد که از این نمونه‌ها ۱٦۸ جدایه(۳۳/۵ درصد) مقاوم به متی‌سیلین بودند و به عنوان MRSA تشخیص داده شدند که درصد نسبتاً بالایی می‌باشد، هم‌چنین در مواردی سویه مقاوم به ونکومایسین و یا دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین یافت شد. در این رابطه پژوهشی در جهان و در ایران انجام شده است تا پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و به خصوص مقاومت نسبت به متی‌سیلین مشخص شود. بررسی‌ها نیز نشان از افزایش سال به سال این سویه دارد. در ایالات متحده سالیانه از هر ۲ میلیون عفونت بیمارستانی، ۲٦۰ هزار مورد مربوط *استافیلوکوکوس اورئوس* است. به طوری که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱٤/۸ درصد در سال ۱۹۸۷ میلادی به ۳۷/۷ درصد در سال ۱۹۹۸ افزایش یافته‌اند(۳۳). در تحقیق ساکولاس و همکاران که در کانادا صورت گرفت از ۳۰۹ جدایه بالینی ۲۱۳ مورد سویه *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم* به متی‌سیلین (٦۸/۹ درصد) و بقیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی‌سیلین تشخیص داده شدند(۳٤). هم‌چنین محرز و همکارن شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در بخش‌های مختلف بیمارستان امام خمینی تهران ٤٦/۵ درصد در بیمارستان امام حسین تهران ۷۹ درصد گزارش کردند که میزان بالای مقاومت در ایران را نشان می‌دهد(۳۵). نتایج مطالعه بشابشه و همکاران به مدت ۵ سال انجام شد نشان داد که با گذشت زمان شیوع سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش‌های انجام شده و مطالعه حاضر نشان دهنده گسترش سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در دنیا می باشد(۳٦). داداشی و همکاران در یک مطالعه مروری به وضعیت میزان مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین در ایران پرداختند. در این مطالعه مشخص گردید که فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در میان پژوهش‌های کشت- مثبت در ایران ٤۳ درصد است. نتایج این مطالعه نشان داد که در گذشته گزارش *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در ایران به ندرت صورت می‌گرفت، اما امروزه این پاتوژن به جزء ثابت بیشتر بیمارستان‌ها و مراکز درمانی کشور تبدیل شده است(۳۷). در مرحله بعدی مطالعه حاضر میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مشخص شد و نتایج نشان داد که خوشبختانه میزان مقاومت به این دارو در جدایه‌های مورد مطالعه بسیار پایین می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از ۵۰۲ جدایه مورد بررسی، در مجموع ۸ جدایه(۱/۵۹ درصد) به عنوان مقاوم به ونکومایسین و یا دارای مقاومت حدواسط در تست میکرودایلوشن براث تشخیص داده شد. عبدالعزیز و همکاران در یک مطالعه مروری متاآنالیز صورت گرفته مشابه که به

بررسی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت به ونکومایسین، سویه‌های دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین یا VISA و سویه‌های هتروژنوس یا hVISA در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته و بر اساس پژوهش‌های ثبت شده در پایگاه‌های اطلاعاتی از ۵۸۵۵ سویه مورد مطالعه ۱/۵ درصد آن‌ها دارای فنوتیپ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین بوده‌اند. میزان فنوتیپ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین در بین ۲۲۲۷۷ جدایه مورد مطالعه ۱/۷ درصد گزارش شده است(۳۸). نکته قابل توجه در این مطالعه این است که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین ، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین و سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* هتروژنوس دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین از سال ۲۰۱۰ به بعد تا سال ۲۰۱۹ در سراسر جهان به ترتیب ۲، ۳/٦ و ۱/۳ برابر بیشتر از این سویه‌ها از سال ۱۹۹۷ تا ۲۰۱۰ می‌باشد. این نتایج افزایش چشم گیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین را در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهد. در این مطالعه مشخص شد که بیشترین فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین و *استافیلوکوکوس اورئوس* هتروژنوس دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین به ترتیب با ۳/٦ و ۵/۲ درصد در ایالات متحده گزارش شده است، در حالی که بیشترین فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین با ۲/۱ درصد در آسیا بوده است(۳۸ و ۳۱). بر اساس این مطالعه بیشتر افزایش مقاومت به ونکومایسین در کشورهای آسیایی و آمریکایی اتفاق افتاده است و اقدامات پیشگیرانه جهت کنترل مقاومت به ونکومایسین در این کشورها ضروری به نظر می‌رسد(۳۹). هر چند که میزان مقاومت به ونکومایسین در مطالعه حاضر در حد پایینی قرار داشت، اما وجود سویه‌های مقاوم در بین سویه‌های مورد مطالعه قابل بررسی و پیگیری بوده، چرا که این سویه‌ها می‌توانند آخرین خط دفاعی در برابر عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* را با شکست مواجه کنند. در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مربوط به نمونه‌های جداسازی شده از کاتتر و کمترین مرتبط با نمونه‌های جداسازی شده از مری و عفونت‌های پوستی بود. در نمونه‌های جداسازی شده از عفونت استخوان نیز هیچ مقاومتی مشاهده نشد. این در حالی است که در مطالعه نوربخش و همکار بالاترین درصد مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مربوط به زخم بود و عفونت کاتتر با ۳/٦ درصد بود. از طرفی همانند این مطالعه در ارتباط عامل متغیر سن نتایج نشان داد که در سنین بالاتر در صد مقاومت

روند افزایشی دارد(٤٠). در مطالعه طبایی و همکاران نیز بیشترین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به میزان ٦٧ درصد از کشت خون، ٣/١٠ درصد از زخم، ٣/١٤ درصد از ترشحات، ٣ درصد از نمونه ادرار و ١/١٥ در صد از سایر موارد شامل نمونه‌های(مایع پلور، بینی، آسیت، آبسه، تراشه، چشم، سینوویال، کاتاتر، بافت و مایع مغزی- نخاعی) جداسازی شده بود(٦). در مطالعه کدخدا و همکاران که بر روی سویه *استافیلوکوک اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین هیچ ارتباطی بین سن و جنس با سویه‌های مقاوم یافت نشد(٤١). بالاترین میزان مقاومت VRSA مربوط به نمونه‌های جداسازی شده از ترشحات بود و در مورد سویه‌های VISA نمونه برای از زخم و برونش صورت پذیرفته بود. سویه‌های مقاوم دیگر مرتبط با نمونه‌های جداسازی شده از عفونت آبسه، زخم بستر و عفونت‌های جراحی بود. در سایر نمونه‌های جداسازی شده نیز هیچ مقاومتی مشاهده نشد. در مطالعه بهلولی و همکاران ٧٨ درصد از نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* هتروژنوس دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین از مجاری تنفسی(بینی و گلو) و تراشه و ٥٠ درصد نمونه‌های سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت حد واسط به ونکومایسین را از نمونه‌های زخم جداسازی نمودند. در این مطالعه هیچ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین جداسازی نشد، در ارتباط عامل متغیر سن نتایج نشان داد که در سنین مختلف در صد مقاومت متفاوت می‌باشد(٣٢). این در حالی است که در مطالعه فیروزی و همکاران هیچ ارتباط معنی‌داری بین جنس و سن افراد با سویه‌های مقاوم یافت نشد(٤٢). در مطالعه سلیم و همکاران، از ٢٣٤ مورد بیشترین نمونه مرتبط با آبسه‌های عفونی می‌باشد و در رده‌های بعدی نمونه‌های مقاوم جداسازی شده از بافت، دستگاه تنفسی، خون بودند. میانگین سنی افراد مورد آزمون در این مطالعه ٢١±٣٤ سال می‌باشد(٤٣). در مطالعه سعید و همکاران در پاکستان انجام شد، نتایج نشان داد که از ١٠٠ نمونه مورد بررسی، که همگی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بوده، عفونت آبسه بیشترین فروانی را داشته که ازین تعداد ٤٨ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین نیز می‌باشد. اولویت‌های بعدی نمونه‌های خون، سپتوم و ترشحات می‌باشد که فروانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین در آن‌ها به ترتیب؛ ٦٣، ٦٥ و ٥٥ درصد می‌باشد که در نهایت نتایج بیانگر مقاومت بالایی به این آنتی‌بیوتیک‌ها در منطقه است و در صورتی این روند ادامه پیدا کند، خطر بالقوه‌ای کشورهای منطقه را تهدید می‌کند(٤٤). در مطالعه شریعتی و همکاران وجود ژن *vanA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین به وسیله PCR نشان داد که ٦٩ درصد از سویه‌های مورد مطالعه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به

ونکومایسین دارای ژن *vanA* بودند و این افزایش میزان *vanA* در این باکتری‌ها را ناشی از یک گونه انتروکوک مقاوم به ونکومایسین یا یکی از دیگراز باکتری‌های دارای ژن *vanA* موجود در دستگاه گوارش انسان می‌دانند، هم‌چنین عدم وجود ژن *vanA* در جدایه‌های دیگر را نشان از ضخیم شدن دیواره سلولی و احتمالاً به دام انداختن میل ترکیبی وانکومایسین گزارش دادند. علاوه بر این، عدم تشخیص ژن *vanB* را گزارش کردند که مطالعه حاضر ژن*vanA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین وجود نداشت و فراوانی ژن *vanB* ۳۷/۵ درصد بود(٤٥). نتایج مطالعه سعادت و همکاران که در بیمارستان‌های شهید فقیهی، نمازی و MRIشهر شیراز انجام شد، نشان داد که فراوانی ژن‌های مقاومت به وانکومایسین(*vanB* و *vanA*) در جنوب ایران بسیار زیاد می‌باشد، در مطالعه حاضر تنها فراوانی ژن *vanB* مشاهده شد و نشان دهنده این موضوع می‌باشد که شیوع ژن *vanA* در بیمارستان‌های سطح کلان شهر تهران کمتر از بیمارستان‌های سطح شهر شیراز می‌باشد(٤٦).

با توجه به پژوهش‌های قبلی برای تشخیص سویه‌های مقاوم و دارای مقاومت حد واسط در روش‌های شناسایی آزمایشگاهی محدودیت‌هایی وجود دارد که کمتر مورد بحث قرار گرفته است. مثلاً روش دیسک آگار دیفیوژن می‌تواند در انتشار ضعیف آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی دارای خطا باشد، چرا که این آنتی‌بیوتیک دارای مولکول‌های بزرگی هستند و سرعت انتشار کمتری در آگار دارند که ممکن است منجر به خطا گردد. لذا توصیه می‌شود برای این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها از روش‌های جایگزین با دقت بالاتر هم‌چون روش حداقل غلظت مهارکنندگی استفاده شود(٤٨ و٤٧)، بنابراین استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب بایدالگوی مقاومتی عامل ایجادکننده عفونت به درستی تشخیص داده شود، این کار منجر می‌شود که آنتی بیوتیک تجویز شده با نوع عفونت متناسب باشد و الزاما از قوی‌ترین و جدیدترین نسل‌های آنتی‌بیوتیک استفاده نگردد، چرا که جهش و موتاسیون می‌تواند این سد دفاعی ایجاد شده را نفوذ ناپذیرتر کند. از طرفی نظارت و کنترل بیشتر جدایه‌های واجد ژن‌های ویرولانس مقاوم به دارو در بیمارستان‌ها، می‌تواند در مورد شرایط حاد افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران حساس مؤثر باشد. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش‌های گذشته و حال خود آگاهی دارند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از ۵۰۲ نمونه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* اخذ شده از چندین بیمارستان شهر تهران، خوشبختانه میزان مقاومت به متی‌سیلین و ونکومایسین در این مطالعه نسبتاً پایین

بـود. عفونـت بـا بـاکتری *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* بسیار شایع بوده و با توجه به پتانسیل بـالا و اهمیـت بالینی که این باکتری از لحاظ بیماری‌های بسیار مهمی که ایجاد می‌کند، همین طور بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن، لزوم شناسایی و بررسی بیشتر آن‌ها بـا اسـتفاده از روش‌های درمانی مناسب و کنترل عفونت ضروری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل از پایانامه دکتری دانشـگاه آزاد اســـلامی واحـــد فلاورجـــان بـــا کـــد اخـــلاق IR.IAU.FALA.REC.1400.001 مـــی‌باشد.پژوهشـــگران از پرسنل بیمارستان‌هـای مـورد مطالعـه کمـال تشـکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

REFERENCES

1.Fathali Z, Mirzaee M, Najarpeerayeh S. Identification sec, hla, pvl and tsst-1 toxins genes profile in of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clinical isolates. Sjimu 2015; 24(4): 32-40.
2.Morell E, Balkin D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. Yale J Biol Med 2010; 83: 223-233.
3.Harris L, Foster S, Richards R. An introduction to *staphylococcus aureus,* and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials. Eur Cell Mater 2002; 4: 39-60.
4.Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000; 61:1-10.
5.Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens In Ardabil, Iran. Iran J Microbiol 2014; 6(3): 163-168.
6.Tabaei S, Kouhi Noghondar M, Mohammadzadeh M, Ataei L, Amel Jamehdar S. Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens: Imam Reza hospital in Mashhad. Med J Mashad 2016; 59(2): 64-70.
7.Rahimi F, Pourshafie M. Aminoglycoside resistance among methicillin resistant *staphylococcus aureus* strains isolated from two hospitals in Tehran. IJIDTM Journal 2015; 20(69): 55-61.
8.Mohajeri P, Farahani A, Davoodabadi A, Ghaderi O, Rahnema M, Heidarzadeh S. Prevalence of vancomycin resistance in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. JKMU 2013; 21(5): 394-404.
9.Zeinali E, Moniri R, Safari M, Mousavi GA. Molecular characterization and SCCmec typing in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. KAUMS 2010; 14(4): 439-446
10.Kaya E, Karakoc E, Yagci S, Yucel M. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus.* Afr J Microbiol Res 2009; 3(12): 84-91.
11.Vaez H, Ghazi Saeidi K, Moradi A, Tabaraei A, Khodabakhshi B, Bazouri M, et al. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009. Iran J Med Microbiol 2010; 3(4): 31-36.
12.Liu C, Chambers H. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(10): 3040-3045.
13.Heidari Soureshjani E, Doosti A, Khalaji Pirbaluti Y. Prevalence and antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from cockroaches from chaharmahal va bakhtiari hospitals. Med Sci 2015; 25(3): 206-212.
14.Prakash V, Lewis JS, Jorgensen JH. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(12): 4528.
15.Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin A. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2012; 76-9.
16.Ojha Kshetry A, Dutt Pant N, Bhandari R, Khatri S, Laxmi Shrestha K, Upadhaya S, et al. Minimum inhibitory concentration of vancomycin to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical samples at a tertiary care hospital in Nepal. Antimicrob Resist Infect Control 2016; 5(27): 1-6.
17.Rahimi Alang S, Amini A, Cheraghali F, Tabbaraei A, Ghaemi E. The frequency of MRSA carriers in health care workers in Gorgan, North of Iran. HealthMED 2011; 5(6): 1885-90.
18.Jafari-Sales A, Farhadi F, Ezdiyadi M, Tarbiat-Nazloo D. Study of antibiotic resistance pattern in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples of hospitals in Tabriz – Iran. Int J BioMed Public Health 2018; 1(2): 71-75.
19.Jouda M, Elbashiti T, Masad A, Albayoumi M. The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotics. World J Pharm Sci 2016; 5(2): 23-33.
20.Azimian A, Havaei A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Mirab Samiee S, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran Jcm. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3581-3585.
21.Atshan S, Shamsudin M, Karunanidhi A, Belkum A, Lung L, Sekawi Z, et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infect Genet Evol 2013; 18: 106-112.

22.Elhassan MM, Ozbak HA, Hemeg HA, Elmekki MA, Ahmed LM. Absence of the mecA gene in methicillin resistant *staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in shendi city, sudan. Biomed Res Int 2015; 2015: 895-860.
23.Praharaj I, Sujatha S, Chandra Parija S. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens. Indian J Med Res 2013; 138(4): 549–556.
24.Purohit G, Gaind R, Dawar R, Verma PK, Aggarwal KC, Sardana R, et al. Characterization of vancomycin resistant enterococci in hospitalized patients and role of gut colonization. J Clin Diagn Res 2017; 11(9): 1-5.
25.Morandi S, Silvetti T, Brasca M. Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. Antonie Van Leeuwenhoek 2013; 103(1): 239-249.
26.Mollaei M, Rashki A. The prevalence of adhesive surface encoding genes in *staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients in zabol-iran by multiplex PCR. JFUMS 2016; 6(3): 296-302.
27.Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003; 111(9): 1265-73.
28.Vanden BM, Yzerman E, Belkum A, Boelens H, Sijmons M, Verbrugh H. Follow-Up of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3133-3140.
29.Horne K, Howden B, Grabsch E, Graham M, Ward B, Xie S, et al. Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3447-3452.
30.Shahkarami F, Rashki S. Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus epidermidis clinical isolates. IJMM 2016; 9(4): 16-23.
31.Zhang SH, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin- intermediate *staphylococcus aureus* isolates. Plos One 2015; 10(8): 1-22
32.Bohlouli P, Nahaei M, Farajnia S, Varshochi M, GhojazadehM, Akbari Dibavar M, et al. Vancomycin sensitivity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates collected from clinical specimens of Tabriz Imam Reza and Sina hospitals by E-test method, agar screening plate and PCR. IJMM 1395; 10(1): 66-75.
33.Ahmadrajabi R, Layegh-Khavidaki S, Kalantar-Neyestanaki D, Fasihi Y. Molecular analysis of immune evasion cluster (IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin-resistant and methicillin-sensitive isolates of *Staphylococcus aureus.* JPREV MED HYG 2017; 58: 308-314.
34.Sakoulas G , Gold H, Venkataraman L, DeGirolami P, Eliopoulos G, Qian Q. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *meca*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3946-3951.
35.Mohraz M, Jonaidi N, Rasoulinejad M, Broum MA, Aligholi M, Shahsavan SH. Determination of prevalence of methicillin resistant *staphylococcus* infections through measurement of mics of s. aureus isolates imam hospital**.** Tehran Univ Med J 2003; 61(3): 182-192.
36.Al Bshabshe A, Joseph MRP, Awad El-Gied AA, Fadul AN, Chandramoorthy HC, Hamid ME. Clinical relevance and antimicrobial profiling of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (mrsa) on routine antibiotics and ethanol extract of mango kernel (*Mangifera indica* L). Biomed Res Int 2020; 1-8
37.Dadashi M, Nasiri M, Fallah F, Owlia P, Hajikhani B, Emaneini M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist 2018; 12: 96-103.
38.Abd El-Aziz N, Abd El-Hamid M, Bendary M, El-Azazy A, Ammar A. existence of vancomycin resistance among methicillin resistant *s. aureus* recovered from animal and human sources in egypt. Slov Vet Res 2018; 55 (20): 221–230.
39.Al-daghistani H, Shquirat W, Al-kharabsh A, Abd al-latif S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) in Iran: A systematic review and meta-analysis. Asian J Pharm Clin Res 2017; 10(5): 349-356.
40.Nourbakhsh F, Momtaz H. Detection of antibiotic resistance patterns in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015*.* J Kurdistan Univ Medical Sc 2015; 19(4): 356-363.

41.Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Houri H, Taghizadehmaleki D, Gita E. Virulence factors in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from children referred to Tehran Children's Medical Center Hospital. SBUMS 2018; 42(4) 59-64.
42.Firouzi F, Akhtari J, Nasrolahei M. Prevalence of MRSA and VRSA strains of *staphylococcus aureus* in healthcare staff and inpatients. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (142): 96-107.
43.Saleem F, Fasih N, Zafar A. Susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to vancomycin and other alternate agents: report from a private sector hospital laboratory. J Pak Med Assoc 2017; 67(11): 1743-1746.
44.Saeed A, Ahsan F, Nawaz M, Iqbal K, Rehman KU, Ijaz T. Incidence of vancomycin-resistant phenotype of the methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in lahore. Antibiotics (Basel) 2020; 9(2): 1-10.
45.Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2020 29; 10(1): 1-16.
46.Saadat S, Solhjoo K, Norooz-Nejad MJ, Kazemi A. VanA and vanb positive vancomycin-resistant *staphylococcus aureus* among clinical isolates in shiraz, south of Iran. Oman Med J 2014; 29(5): 335-339.
47.Ahmadrajabi R, Layegh-Khavidaki S, Kalantar-Neyestanaki D, Fasihi Y. Molecular analysis of immune evasion cluster (IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin-resistant and methicillin-sensitive isolates of *Staphylococcus aureus*. J Prev Med Hyg 2017; 58: 308-14.
48.Joana S, Pedro P, Elsa G. Is vancomycin MIC creep a worldwide phenomenon? Assessment of *S. aureus* vancomycin MIC in a tertiary university hospital. BMC Res Notes 2013; 65(6): 1-4.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Antibiotic Resistance Patterns of Methicillin and Vancomycin -Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Tehran Hospitals' Clinical Samples

Eslamnezhad N[1], Ghandehari F[1*], Mirzaee M[2], Madani M[1], Mehrabi MR[2]

[1]Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, [2]Department of Biology, School of Basic Sciences, Boroujerd Azad University, Boroujerd, Iran

Received: 16 May 2021 Accepted: 15 Aug 2021

Abstract:

Background & aim: One of the most important challenges today is the spread of methicillin and vancomycin resistant strains of Staphylococcus aureus. Acquisition of antibiotic resistance and changes in staphylococcal pathogenicity patterns are the most important causes of virulence. Therefore, the aim of the present study was to determine and identify the pattern of antibiotic resistance in methicillin and vancomycin resistant strains of Staphylococcus aureus isolated from clinical samples of metropolitan hospitals in Tehran.

Methods: In the present cross-sectional descriptive study conducted in 2018, 502 clinical specimens of Staphylococcus aureus were identified and confirmed by biochemical tests and amplification of s_rRNA16 gene by PCR. All isolates were tested for resistance to methicillin by disk method and for resistance to vancomycin using the least inhibitory concentration method. Finally, both groups were tested for molecular weight. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance and error coefficient less than 0.05% using statistical tests.

Results: Out of 502 isolates, 168 isolates were resistant to methicillin (33.46%), 6 isolates were resistant to vancomycin (1.19%) and 2 isolates had intermediate resistance to vancomycin (0.39%). The frequency of mecA gene in isolates Methicillin resistance was 98.8%, vanB and vanC1 gene frequency was 37.5% each and vanC3 gene frequency was 12.5% in vancomycin resistant isolates. The highest resistance of methicillin-resistant isolates was isolated from the catheter and the highest resistance of vancomycin-resistant isolates with intermediate resistance to vancomycin were isolated from the secretion site. In both groups, the highest resistance was related to adults.

Conclusion: VRSA and MRSA are considered as a serious threat for human health. Correct detection of the infection resistance patterns and the use of convenient antibiotic can decrease the speed of the development of bacteria resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, VRSA, VISA, *mecA*, *Van* genes

[*]**Corresponding Author: Kandahari F,** Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
Email: fe_gh_2010@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Eslamnezhad N, Ghandehari F, Mirzaee M, Madani M, Mehrabi MR. Antibiotic Resistance Patterns of Methicillin and Vancomycin -Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Tehran Hospitals' Clinical Samples. Armaghane-danesh 2021; 26(5): 793-814.