https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en
Biological Journal of Microorganism
12rd Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 69-79
Received: 16.07.2022 Accepted: 29.09.2022

(Research Paper)

The Prevalence of the *vanA* Gene in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Patients with Bedsores

Fatemeh Amohammadshirazi
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran, ft.shirazi76@yahoo.com
Zeinab Rezaei
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran, zeinabrezaee76@gmail.com
Seyed Mahmoud Barzi
Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, mah.barzi@gmail.com
Niusha Bahreini Moghaddam
Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran, niusha.b.moghaddam@gmail.com
Farzad Badmasti
Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, fbadmast2008@gmail.com
Morvarid Shafiei*
Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, dr.shafiei80@gmail.com

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus*, especially Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureu*, (MRSA) is one of the major causes of nosocomial and community-acquired infections. Nowadays, it is known as a health problem in the world due to its resistance to most antibiotics. The present study aimed to determine the prevalence of the *vanA* gene in MRSA isolated from patients with bedsores.

Materials and Methods: In the current study, 80 clinical isolates were collected from patients with bedsores at Loghman-e Hakim Hospital, Iranmehr Hospital, and Tehran Wound Center. The samples were identified using standard laboratory tests and resistance to cefoxitin disk

*Corresponding Author

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.134409.1479

(30µg) and evaluating the presence of the *mecA* gene. The resistance of the MRSA isolates to different antibiotics was checked using the disc diffusion method. The presence of the *vanA* gene in these isolates was investigated using specific primers and polymerase chain reaction (PCR).

Results: Of the studied isolates, 29 isolates were identified as methicillin-resistant. The highest antibiotic resistance level was observed against erythromycin and clindamycin. The lowest antibiotic resistance level was determined against linezolid with 82.75%, 82.75%, and 13.8% respectively. The *vanA* gene was detected in all of the MRSA isolates. Also, multidrug resistance (MDR) was observed in almost 72.41% of isolates.

Discussion and Conclusion: The prevalence of the *vanA* gene has increased in MRSA isolates. In this regard, high and multiple isolates of *Staphylococcus aureus* resistant to common antibiotics should be considered a serious matter.

Key words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus;* the *vanA* Gene; Nosocomial Infections

https://bjm.ui.ac.ir
زیســـــت‌شناســـــی میکروارگانیســـــم‌هـــــا
سـال دوازدهـم، شـماره ۴۶، تابسـتان ۱۴۰۲، صـفحه ۶۹- ۷۹
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۵ تاریخ پـذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

مقاله پژوهشی

فراوانی ژن *vanA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (*MRSA*) جداشده از بیماران مبتلا به زخم بستر

فاطمه امحمد شیرازی: کارشـناس ارشـد گـروه میکروبیولـوژی، دانشـکدهٔ علـوم زیسـتی، دانشـگاه الزهـرا، تهـران، ایـران، ft.shirazi76@yahoo.com
زینـــب رضـــایی: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران، zeinabrezaee76@gmail.com
سید محمـود بـرزی: کارشـــناس ارشـــد گـــروه بـــاکتری‌شناســـی، انستیتوپاســـتور ایـــران، تهـــران، ایـــران، mah.barzi@gmail.com
نیوشا بحرینی مقـدم: کارشناس ارشد دانشکدهٔ علوم پایه و فناوری های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران، niusha.b.moghaddam@gmail.com
فـــرزاد بادمســـتی: اســـتادیار گـــروه بـــاکتری‌شناســـی، انستیتوپاســـتور ایـــران، تهـــران، ایـــران، fbadmast2008@gmail.com
مروارید شـفیعی*: اســـتادیار گـــروه بـــاکتری‌شناســـی، انستیتوپاســـتور ایـــران، تهـــران، ایـــران، dr.shafiei80@gmail.com

چکیده

مقدمـه: *استافیلوکوکوس اورئـوس* بـه‌ویـژه *استافیلوکوکوس اورئـوس* مقـاوم بـه متـی‌سـیلین (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* یا MRSA) یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت جامعه و بیمارستان است و امروزه به‌دلیـل مقاومـت به داروهای ضدمیکروبی به یکی از نگرانی‌های عمدهٔ سلامت تبدیل شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی ژن *vanA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) جداشده از نمونه‌های زخم بستر است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۸۰ جدایه بالینی از بیماران مبتلا به زخـم بسـتر در بیمارسـتان‌هـای لقمـان حکـیم، ایرانمهر و مرکز زخم تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بـا اسـتفاده از تسـت‌هـای اسـتاندارد آزمایشـگاهی و مقاومـت بـه دیسـک سفوکسـیتین (۳۰ میکروگـرم) و بررسـی حضـور ژن *mecA* تعیـین هویـت شـدند. مقاومـت جدایـه‌هـای

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.134409.1479

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به کمک روش انتشار از دیسک بررسی شد. حضور ژن *vanA* در این جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (*Polymerase chain reaction* یا *PCR*) بررسی شد.

نتایج: از ۸۰ جدایه بررسی‌شده، ۲۹ جدایه به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین شناخته شد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین و اریترومایسین و کمترین مقاومت به لینزولید به‌ترتیب با ۸۲/۷۵ درصد، ۸۲/۸۷۵ درصد و ۱۳/۸ درصد مشاهده شد. ژن *vanA* در تمام جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین تشخیص داده شد. در حدود ۷۲/۴۱ درصد از جدایه‌ها مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی گزارش شد.

بحث و نتیجه‌گیری: فراوانی ژن *vanA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین افزایش یافته است و وجود مقاومت بالا و چندگانه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج باید به‌عنوان یک موضوع جدی شایان توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ژن *vanA*، عفونت بیمارستانی

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] یک میکروارگانیسم گرم مثبت کروی شکل، غیرمتحرک و غیراسپورزا است (۱). این باکتری یک پاتوژن فرصت‌طلب است که می‌تواند باعث ایجاد عفونت‌های سطحی و تهاجمی شود. عفونت‌های استافیلوکوکی زمانی رخ می‌دهند که مکانیسم‌های دفاعی میزبان به‌دلیل بیماری‌های طولانی‌مدت، زخم‌های باز، درمان با استروئیدها یا سایر داروهایی که سیستم ایمنی را به خطر می‌اندازند، کاهش یابد (۲). زیستگاه طبیعی این باکتری پوست و مخاط بینی است و حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد از افراد جمعیت می‌توانند ناقل دائمی این باکتری باشند.

در دنیای امروز ارتباط مستقیمی بین میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجادشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت این باکتری است که در سراسر جهان نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج رو به افزایش است که مهم‌ترین و عمده‌ترین آنها آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین، نفی‌سیلین، مونوباکتام‌ها، کاربا‌پنم‌ها، نافی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها هستند. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)[2] سویه خاصی از این باکتری است که به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۳).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نخستین‌بار دو سال بعد از معرفی و استفاده از متی‌سیلین، در سال ۱۹۶۱ در انگلیس گزارش شد (۴). مقاومت به متی‌سیلین توسط ژن *mecA* ایجاد می‌شود و به‌واسطهٔ انتقال افقی یک قطعه ژنتیکی متحرک به دست می‌آید که توسط کاست کروموزومی استافیلوکوکی (SCC*mec*)[3] تعیین شده است. ژن *mecA* پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین 2a (PBP 2a)[4] را رمزگذاری می‌کند. این پروتئین، آنزیمی است که باعث اتصال عرضی واحدهای پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی

باکتری می‌شود. این آنزیم تمایل کمتری برای اتصال به بتالاکتامازها دارد که همین مسئله مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک‌ها را به دنبال دارد.

اگرچه MRSA در دهه ۱۹۶۱ از بیماران بستری در بیمارستان جداسازی شد، از دهه ۱۹۹۰ به سرعت در جامعه گسترش یافت. MRSA می‌تواند موجب بیماری‌های عفونی شدید در انسان ازجمله اندوکاردیت، عفونت استخوان (استئومیلیت)، عفونت‌های پوستی و بافت نرم، پنومونی و سپتی سمی شود (۱و۵).

امروزه تنها آنتی‌بیوتیک انتخابی برای درمان عفونت‌های ناشی از MRSA آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی مانند ونکومایسین است. ونکومایسین گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند. ژن‌های *vanA*، *vanB*، *vanC1*، *vanC2/C3*، *vanG*، *vanL* و *vanX* مسئول کدکردن مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله گروه بتالاکتام هستند. مقاومت *VanA* و *VanB* غالب‌ترین نوع مقاومت بوده است که می‌توانند روی پلاسمید یا کروموزوم قرار بگیرند و ازطریق کونژوگاسیون منتقل شوند. این ژن‌ها به‌ترتیب روی ترانسپوزون‌های Tn1546 و Tn1547 قرار دارند. این ژن‌ها توانایی انتقال بین گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس را دارند که یکی از مشکلات بزرگ درمان عفونت‌های این باکتری است. ژنوتایپ *VanA* از بقیه مهم‌تر است (۶و۷).

مقاومت به ونکومایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* به سه شکل VISA (Vancomycin Intermediate *S.aureus*)، hVISA (hetero Vancomycin Intermediate *S.aureus*) و VRSA (Vancomycin Resistant *S.aureus*) است. ظهور سویه‌های VISA و hVISA به‌دلیل ضخیم‌شدن دیواره سلولی رخ داده است و ژن *van* نقشی در ایجاد این سویه‌ها ندارد (۸).

نخستین‌بار سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین در سال 2002 از بیماری در کشور آمریکا جدا شد. این سویه ژن مقاومت به ونکومایسین و مقاومت به متی‌سیلین (VRSA) دارد (۹و۱۰).

ظهور سویه‌های VRSA در بیمارستان‌ها یک تهدید واقعی برای بهداشت عمومی تلقی می‌شود؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تعیین فراوانی ژن *vanA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) جداشده از نمونه‌های زخم بستر است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تشخیص باکتری‌ها: در مطالعه حاضر، ۸۰ جدایه باکتری از نمونه‌های زخم بستر بیماران بستری در بیمارستان‌های لقمان و ایرانمهر و مرکز زخم تهران که در سال ۱۳۹۹ بستری بودند با تشخیص اولیه استافیلوکوکوس، به کمک سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی، جمع‌آوری و سواب‌ها در ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شدند. نمونه‌ها در جعبه‌های مخصوص حمل نمونه[5] در دمای محیط به بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. تمام مراحل آزمایش روی ۸۰ نمونه بالینی و سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین MRSA (ATCC6538) انجام شدند.

همه نمونه‌ها ابتدا در محیط بلاد آگار به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای تعیین هویت جدایه‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر تست کاتالاز، تخمیر مانیتول، تست DNase و تست کوآگولاز استفاده شد.

درنهایت، جدایه‌ها در محیط نگه‌دارندهٔ باکتری‌ها (تریپتیک سوی براث[6] حاوی ۱۵ درصد گلیسرول) منتقل و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای حفظ و نگهداری منتقل شدند (۱۱و۱۲).

تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

تشخیص فنوتیپی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) با روش انتشار دیسک[7] (دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم روی محیط مولر هینتون آگار) و اندازه‌گیری قطر ناحیه مهار رشد (قطر ناحیه مهار رشد ≤ ۲۱ میلی‌متر) تشخیص داده شد. مؤسسه استانداردهای کلینیکی و بالینی[8] استفاده از سفوکسیتین را به جای استفاده از اگزاسیلین در روش انتشار دیسک برای تعیین *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین توصیه می‌کند (۱۳).

تشخیص ژنوتیپی با بررسی حضور ژن *mec A*: حضور ژن *mecA* با کمک آغازگرهای اختصاصی *mecA*(F) (5´GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3´) و *mecA*(R) (5´ CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA -3´) و روش PCR با ۲۵ میکرولیتر مخلوط حاوی ۱۰ میکرولیتر DNA مدنظر، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس و ۱/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل تأیید شد. این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف)[9] قرار گرفت و با برنامه واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۸ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر به DNA هدف در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه دنبال شد و مرحله طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی: به‌منظور انجام روش انتشار دیسک (کربی - باثر)[10] از کشت ۲۴-۱۸ ساعتی باکتری، سوسپانسیونی در محیط مولر هینتون براث (مرک، آلمان) تهیه شد که کدورتی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند ($1/6\times10^8$ CFU/mL) دارد و سپس با استفاده از سوآب استریل روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت یکنواخت و چمنی داده شد. سپس در شرایط استریل دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (مرک، آلمان) با رعایت فاصله مناسب از یکدیگر شامل لینزولید (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) روی سطح محیط قرار داده شدند. نتایج پس از ۲۴ ساعت انکوبه‌کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با اندازه‌گیری قطر ناحیه مهار رشد باکتری و براساس استاندارد CLSI گزارش شدند (۱۴و۱۵).

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد[11] ونکومایسین: برای انجام تست MIC، سوسپانسیونی به کدورت نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. درنهایت، سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا کدورتی معادل $1/6\times10^6$ CFU/mL به دست آید.

به‌منظور تهیه محلول آنتی‌بیوتیک، ۰/۰۱ گرم از پودر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین وزن شد و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک ونکومایسین با غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر براساس

جدول مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی CLSI و با روش Serial dilution method آماده و ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت، در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیز به آن اضافه شد. چاهک کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و چاهک کنترل منفی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط به تنهایی در نظر گرفته شد. سپس میکروتیتر پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ انکوبه شد. بعد از گذشت زمان مدنظر میکروتیتر پلیت زیر نور چراغ مطالعه بررسی و کمترین رقت فاقد کدورت به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حضور داشتن یا نداشتن ژن *vanA* به کمک تست مولکولی PCR: ابتدا استخراج DNA به روش جوشاندن (boiling) انجام شد (۱۶). غلظت و خلوص DNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ (EPOCH) تعیین شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (۱۰ میکرولیتر DNA مدنظر، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس و ۱/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل) و برنامه دمایی ذکرشده در جدول ۲ برای ژن *vanA* در ۳۰ سیکل PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف) انجام گرفت (۱۷).

جدایه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (ATCC6538) MRSA به‌عنوان جدایه کنترل مثبت استفاده شد.

در این پژوهش آغازگرهای مربوط به ژن‌های *mecA* و *vanA* به‌صورت جداگانه و کاملاً اختصاصی با کمک نرم‌افزار پرایمر ۳[۱۲] طراحی و پس از بلاست[۱۳]کردن از شرکت پیشگام تهیه شدند.

پس از انجام آزمایش PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و در دستگاه ژل داک (UVITEC) در زیر نور UV بررسی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای ردیابی ژن *vanA*

محصول PCR	توالی	نام پرایمر	نام ژن
580 bp	5´-ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG-3´	*vanA*(F)	*vanA*
	5´-CTGTATCCGTCCTCGCTCCT-3´	*vanA*(R)	

جدول ۲- برنامه PCR برای ژن *van A*

تکثیر نهایی		تعداد چرخه ۳۰						دناتوره‌شدن اولیه		
زمان	دما	زمان	دمای تکثیر	زمان	دمای اتصال	زمان	دمای دناتوره	زمان	دما	ژن
۱۰´	۷۲°C	۱´	۷۲°C	۳۰″	۵۳°C	۳۰″	۹۵°C	۱۰´	۹۵°C	*van*A

نتایج

با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمایی، از میان هشتاد نمونه جداشده از بیماران مبتلا به زخم بستر، ۶۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس بودند که از این تعداد، براساس تشخیص فنوتیپی و ژنوتیپی، ۲۹ عدد از جدایه‌ها (۴۷/۶۱ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بودند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: براساس نتایج تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین، ۸۶/۲ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک

لینزولید حساس بودند. ۷۲/۴۱ درصد از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، ۸۲/۷۵ درصد از جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و ۸۲/۷۵ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین مقاوم بودند؛ بنابراین، بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک لینزولید و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و کلیندامایسین مشاهده شده است. در این مطالعه با توجه به نتایج دیده‌شده، مقاومت چند دارویی (MDR)[۱۴] نیز مشهود است؛ زیرا تعدادی زیادی از جدایه‌ها به چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان داده‌اند.

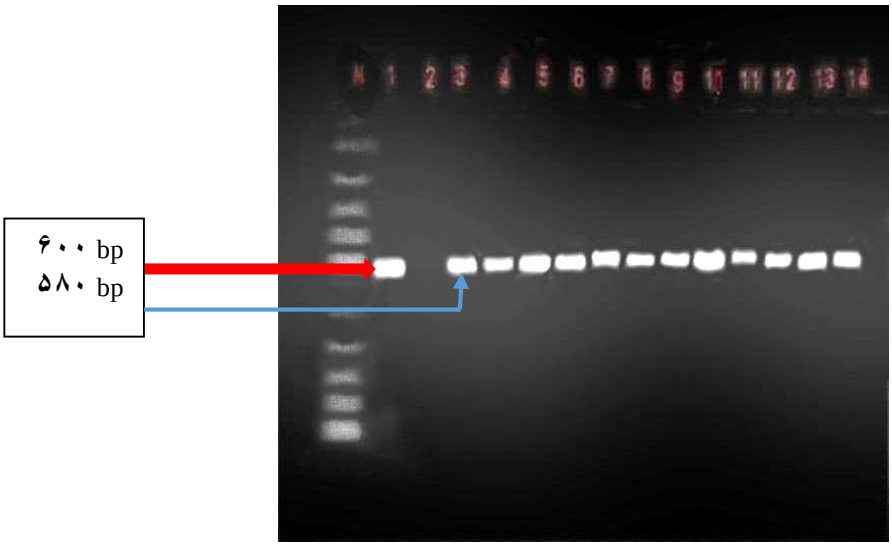
تعیین حداقل غلظت مهاری ونکومایسین: نتایج حداقل غلظت مهاری ونکومایسین در جدول ۳ گفته شده‌اند. جدایه‌هایی که MIC آنها ≤ ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، به‌عنوان مقاوم به ونکومایسین در نظر گرفته می‌شوند و تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، مقاوم به ونکومایسین[۱۵] بودند.

بررسی حضور ژن *vanA* با استفاده از PCR: درنتیجهٔ تست مولکولی PCR، باندهای ایجادشده در اندازه ۵۸۰ جفت‌باز، وجود ژن *vanA* (ژن مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین) را در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین تأیید کرد.

تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین دارای ژن *vanA* بودند. این نتیجه در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۳- تعیین حداقل غلظت مهاری ونکومایسین

درصد فراوانی جدایه‌ها	MIC
۳/۴۷	۵۱۲
۶/۸۹	۱۲۸±۰/۰۷
۱۷/۲۴	۶۴±۰/۲۵
۲۴/۱۳	۳۲±۰/۳۵
۴۸/۲۷	۱۶±۰/۲



شکل ۱- نتایج تست PCR برای ژن *vanA*، از چپ به راست: مارکر (M): ladder 100 bp-3 kbp، کنترل مثبت (۱)، کنترل منفی (۲)، ۳ تا ۱۴ نمونه‌های مثبت دارای ژن مقاومت به ونکومایسین

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس در چند دهه گذشته مبدل به شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی شده است. یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت 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 (۱۸).

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به‌طور فزاینده‌ای در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده است. از آنجا که میزان مرگ‌ومیر عفونت‌های بیمارستانی با سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بالا است، شناسایی سریع و دقیق این سویه‌ها، برای کمک به پزشکان و انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و جلوگیری از گسترش آنها لازم است (۱۹).

در پژوهش حاضر از ۶۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران مبتلا به زخم بستر جدا شدند، نزدیک به نیمی از جدایه‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند که علاوه بر مقاوم‌بودن نسبت به سفوکسیتین، با روش مولکولی PCR ژن *mecA* در آنها شناسایی شد. سایر مطالعات نیز حضور ژن *mecA* را در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کرده‌اند؛ برای مثال، صاحب نسق و همکاران در تهران ۱۲۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بالینی را بررسی کردند و ازنظر فنوتیپی ۷۸/۲ درصد از جدایه‌ها و ازنظر ژنوتیپی ۹۶ درصد از جدایه‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند. آنها علت این تفاوت را عدم بیان یکنواخت ژن *mecA* گزارش کردند و روش PCR را به‌عنوان استاندارد طلایی در تشخیص جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین ذکر کردند (۲۰). در مطالعه جعفری ثالث و همکاران، ۷۵ جدایه از ۱۰۰ نمونه جداشده از بیمارستان‌ها و مراکز درمانی تبریز ازنظر فنوتیپی و ژنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین بودند (۲۱). الیویرا[۱۶] و همکاران نیز ۵۳۹ جدایهٔ این باکتری را از لحاظ حضور *mecA* آزمایش کردند و ۴۹ درصد از جدایه‌ها برای این ژن مثبت بودند (۲۲). در مطالعه السعدی و همکاران نیز ۲۰۰ نمونه باکتری از منابع مختلف جداسازی شدند که ۸۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و ۹۰ درصد از این جدایه‌ها ازنظر فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین بودند و همگی ژن *mecA* را داشتند (۲۳).

تفاوت‌های موجود بین نتایج پژوهش‌های مختلف می‌توانند با حجم نمونه مطالعه‌شده، استرس انتخابی آنتی‌بیوتیک در منطقه بررسی‌شده، منشأ باکتری‌های مدنظر و همچنین روش تعیین مقاومت به متی‌سیلین مرتبط باشند (۲۴).

در پژوهش حاضر، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به اریترومایسین و کلیندامایسین با ۸۲/۷۵ درصد و کمترین مقاومت به لینزولید با ۱۳/۸ درصد در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مشاهده شد. تحقیقات مشابه انجام‌شده در سایر مناطق برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، در برخی موارد نتایج مشابه و در برخی نتایج متفاوت با پژوهش حاضر را نشان داده‌اند؛ ازجمله در مطالعه مرغکی و همکاران، از ۵۷ جدایه بررسی‌شده، بیشترین مقاومت به تتراسایکلین (۹۰ درصد) و اریترومایسین (۸۸ درصد) گزارش شد که در مطالعه حاضر نیز میزان مقاومت به این دو آنتی‌بیوتیک بالا بود (۲۵). در مطالعه مهدیون و همکاران از بین ۱۰۰ نمونه جداشده از بیمارستان‌های ساری و تهران، همه جدایه‌ها به اگزاسیلین و سفوکسیتین

مقاوم بودند و پس از آن، بیشترین و کمترین میزان مقاومت به‌ترتیب به اریترومایسین با ۸۵/۱ درصد و کوتریموکسازول با ۲۴/۷ درصد گزارش شد (۱۸).

اختلاف موجود در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در تحقیقات مختلف می‌تواند وابسته به حجم نمونه بررسی‌شده، جامعه آماری مطالعه‌شده، منبع اخذ نمونه، کیفیت دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده‌شده و از همه مهم‌تر، فشار انتخابی آنتی‌بیوتیک مصرفی در منطقه مدنظر باشد (۲۴).

از دیگر اهداف پژوهش حاضر، بررسی حضور ژن *vanA* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بود و تمامی جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین نیز مقاومت نشان دادند. به عبارتی دیگر، تمام جدایه‌های مطالعه‌شده علاوه بر مقاوم‌بودن نسبت به متی‌سیلین، به ونکومایسین نیز مقاوم و دارای ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ≤ MIC بودند. این در حالی است که در سال‌های گذشته ونکومایسین جزء آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برای پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بوده است.

در مطالعه احمدی شعار و همکاران (۱۳۸۵) در تبریز هیچ مورد مقاوم یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین گزارش نشد و دامنه MIC سویه‌های آزمایش‌شده بین ۳-۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۶). در مطالعه تاتی و همکاران (۲۰۱۱) در حیدرآباد تعداد ۱۶ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* MIC در حدود ۸-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان دادند که به‌عنوان VISA گزارش شدند (۲۷). نتایج این دو مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارند؛ اما در مطالعه امیری و همکاران (۱۳۹۷)، ۶۸/۷ درصد سویه‌ها دارای ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ≤ MIC بودند که نشان‌دهندهٔ افزایش مقاومت به ونکومایسین در سال‌های اخیر است (۷).

در مطالعه حاضر نیز مقاومت به ونکومایسین به میزان چشمگیری افزایش یافته است؛ به‌گونه‌ای‌که تمامی جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاومت نشان داده‌اند. در مطالعه سیستمیک و بررسی‌های متاآنالیزی که وو[۱۷] و همکاران انجام دادند، میزان شیوع جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۲۰ بررسی شد و نتایج حاکی از افزایش ۳/۵ برابری شیوع این جدایه‌ها بودند. همچنین این پژوهش نشان داد میزان شیوع جدایه‌های مقاوم به ونکومایسین در آسیا و آفریقا در مقایسه با آمریکا و اروپا بیشتر است (۲۸).

در مطالعه حاضر، بررسی مقاومت چندگانه باکتری‌های بررسی‌شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی نشان داد در حدود ۷۲/۴۱ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مقاومت چند دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین و ونکومایسین داشتند. مقاومت‌های چند دارویی به سیستم بهداشت و درمان آسیب‌های جدی از لحاظ اقتصادی و درمانی وارد می‌کند.

به نظر می‌رسد مصرف خودسرانه و بی‌رویه داروها باعث ایجاد مقاومت بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شده است. همچنین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد انتقال ژن مقاوم به ونکومایسین سرعت بیشتری پیدا کرده و درحال افزایش است.

References

(1) Algammal AM., Hetta HF., Elkelish A., Alkhalifah DH., Hozzein WN., Batiha GE., El Nahhas N., Mabrok MA. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Journal of Infection and Drug Resistance* 2020; 13: 3255–65.

(2) Craft KM., Nguyen JM., Berg LJ., Townsend SD. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus phenotype*. 2019;

(3) Becker K., Denis O., Roisin S., Mellmann A., Idelevich EA., Knaack D., van Alen S., Kriegeskorte A., Köck R., Schaumburg F., Peters G. Detection of mecA-and mecC-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates by the new Xpert MRSA Gen 3 PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54 (1): 180–4.

(4) Lee AS., De Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Nature Reviews Disease Primers* 2018; 4 (1): 1–23.

(5) Turner NA., Sharma-Kuinkel BK., Maskarinec SA., Eichenberger EM., Shah PP., Carugati M., Holland TL., Fowler VG. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: An overview of basic and clinical research. *Journal of Nature Reviews Microbiology* 2019; 17 (4): 203–18. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4.

(6) Nemati F., Mohammadzaki M., Shamohammadi S., Ghasemi Z., Eskandari E. Evaluation of VanA And VanB genes in cefoxitin resistant staphylococcus aureus causing skin infections in hospitalized patients in Razi Hospital, Tehran, using real time PCR method. *Journal of Dermatology and Cosmetic* 2017; 8 (1): 22-6. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=597887.

(7) Amiri E., Anvari M. Surveying drug resistance of Staphylococcus aureus strains resistant to the antibiotic vancomycin in some hospitals in Rasht. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch* 2018; 28 (1): 74–80.

(8) Firouzi F., Akhtari J., Nasrolahei M. Prevalence of MRSA and VRSA strains of Staphylococcus aureus in healthcare staff and inpatients. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2016; 26 (142): 96-107

(9) Izanloo A., Bahreini M., Sharifmoghadam MR., Azimian A. Evaluation of vancomycin resistance by Phenotypic and genotypic methods among S. aureus strains isolated from patients. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* 2016; 8 (2): 215–24.

(10) Shajari G., Khorshidi A., Moosavi G. Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus strains. *Archives of Razi Institute* 2017; 90 (54): 107–10.

(11) CLSI. *Quality Control for Commercially Prepared*. 2004.

(12) Vandepitte J., Engbaek K., Rohner P., Piot P., Heuck CC., Organization WH. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. J. Vandepitte ... [et al.] [Internet]. 2nd ed. Geneva PP. Geneva: World Health Organization. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/42696.

(13) Broekema NM., Van TT., Monson TA., Marshall SA., Warshauer DM. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of mecA-mediated resistance in Staphylococcus aureus in a large-scale study. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47 (1): 217–9.

(14) Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *Journal of American Society for Microbiology* 2009; 15: 55–63. Available from: https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro.

(15) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Vols. M100-Ed32, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2021. 260 p.

(16) Fatholahzadeh B., Hashemi FB., Emaneini M., Aligholi M., Nakhjavani FA., Kazemi B. *Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections*. Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences. 2006.

(17) Güven S., Yilmaz E., Kutbay H., Sariyildiz S., Dalar L., Poluman A. The diagnostic value of polymerase chain reaction (PCR) in bronchioalveolar lavage. *Eastern Journal of Medicine* 2004; 9 (1): 7–12.

(18) Mahdiyoun SM., Ahanjan M., Goudarzi M., Rezaee R. Prevalence of antibiotic resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus and determining aminoglycoside resistance gene by PCR in Sari and Tehran hospitals. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2015; 25 (128): 97–107.

(19) Vahabi S., Nadri S., Izadi F. The effects of gabapentin on severity of post spinal anesthesia headache. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 27 (5): 1203–7.

(20) Sahebnasagh R., Saderi H., Owlia P. The prevalence of resistance to methicillin in Staphylococcus aureus strains isolated from patients by PCR method for detection of mecA and nuc Genes. *Iranian Journal of Public Health* 2014; 43 (1): 84–92.

(21) Jafari-Sales A., Jafari B. Evaluation of the Prevalence of mec A Gene in Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens of hospitals and treatment centers. *Pajouhan Scientific Journal* 2019; 17 (3): 41–7. Available from: http://psj.umsha.ac.ir/article-1-471-fa.html.

(22) Pac M., Rodrigues A., Oliveira C., Carvalho D., Ferreira J., Chaves P., et al. *European Journal of Public Health*, Vol. 30, Supplement 2, 2020. 2020; 30: 4–5.

(23) Al-Saadi DA., Abd Al-Mayahi FS. Antibiogram susceptibility patterns of Staphylococcus aureus harboring of MecA gene and prevalence aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes in Iraq. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2021; 923 (1).

(24) Naebi S., Ghiamirad M. The prevalence of methicillin resistance and the presence of mecA and pvl genes in Staphylococcus aureus isolated from Valiasr hospital, Tabriz, Iran. *Journal of Isfahan Medical School* 2021; 39 (645): 778–85.

(25) Marghaki FS., Nave HH., Kalantar-Neyestanaki D., Safaari F., Fasihi Y., Moradi M. Frequency of aminoglycoside-resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2017; 27 (153): 112–7.

(26) Ahmadi Shoar Sh., Nahaei MR., Amir Mozafari N. Sensitivity of Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens against vancomycin by using E-test in Tabriz. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2008; 30 (2): 17-23. Available from: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=171289.

(27) Thati V., Shivannavar CT., Gaddad SM. Vancomycin resistance among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *The Indian Journal of Medical Research* 2011; 134 (11): 704–8.

(28) Wu Q., Sabokroo N., Wang Y., Hashemian M., Karamollahi S., Kouhsari E. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance Staphylococcus aureus isolates. *Journal of Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2021; 10 (1): 1–3. Available from: https://doi.org/10.1186/s13756-021-00967-y.

[1]- *Staphylococcus aureus*
[2]- *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
[3]- Staphylococcal cassette chromosomes *mec*
[4]- Penicillin binding protein 2a
[5]- Safty box
[6]- Tryptic Soy Broth (TSB)
[7]- Disk diffusion
[8]- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
[9]- Eppendorf
[10]- Kerbi-bauer
[11]- Mnimum Inhibitory Concentration
[12]- Primer 3
[13]- Blast
[14]- Multi-Drug-Resistant
[15]- Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus (VRSA)
[16]- Oliveira
[17]- Wu