ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of Antibiotic Resistance in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Determining Aminoglycoside Resistance Gene by PCR in Sari and Tehran Hospitals

Seyyed Mohsen Mahdiyoun[1],
Mohammad Ahanjan[2],
Mehdi Goudarzi[3],
Razieh Rezaee[4]

[1]MSc Student in Microbiology, Faculty Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran
[2] Mazandaran Pediatric Infectious Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] MSc in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received February 24, 2015 ; Accepted August 23, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is one of the major causes of community and hospital-acquired infections. Aminoglycosides are potent bactericidal agents that are often used in combination with beta-lactam or glycopeptide in treatment of staphylococcal infections. The aim of this study was to investigate the prevalence of the aminoglycoside modifying enzyme aac(6´)-Ie/aph(2") genes and mecA.

Materials and methods: In current study, 174 clinical isolates of MRSA from different clinical specimens were tested for antibiotic susceptibility using the Kirby Bauer method. MRSA isolates were detected by disc diffusion method using 1 ug oxacillin and 30 ug cefoxitin discs. Then, MRSA strains were further analyzed for detection of mecA and aminoglycoside resistant aac (6´)-Ie/aph (2˝) genes by PCR.

Results: All strains were resistant to oxacillin and cefoxitin. The highest and lowest resistances were found against erythromycin (85.1%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (24.7%), respectively. In PCR, mecA gene was detected in 100% of the strains and 77% of the strains were found to harbor aac(6′)/aph(2//)-Ia gene.

Conclusion: According to this study, the prevalence of aminoglycosides resistant genes is increasing in MRSA isolates.

Keywords: mecA gene, aac(6´)-Ie/aph(2˝) gene, aminoglycoside modifying enzyme, *Staphylococcus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(128): 97-107 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۸ شهریور سال ۱۳۹۴ (۱۰۷-۹۷)

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و تعیین ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید به روش PCR در بیمارستان های ساری و تهران

سید محسن مهدیون[۱]
محمد آهنجان[۲]
مهدی گودرزی[۳]
راضیه رضایی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوک اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت جامعه و بیمارستان است. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری کش قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی مصرف می‌شوند. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن aac(6′)-Ie/aph(2″) کدکننده یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن mecA است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۷۴ , MRSA جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی، برای تعیین مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌ها با روش کربی بوئر انجام شد. وجود MRSA با گذاشتن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین و سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفت. سپس DNA جدا شده از MRSA برای یافتن ژن‌های mecA و ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها aac(6′)-Ie/aph(2″) به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تمامی جدایه‌ها به اگزاسیلین و سفوکسیتین مقاوم بودند و پس از آن بیش‌ترین وکم‌ترین مقاومت به ترتیب به اریترومایسین با ۸۵/۱ درصد و کوتریموکسازول با ۲۴/۷ درصد مشاهده شد. در PCR ۱۰۰ درصد سویه‌ها از نظر ژن mecA و ۷۷ درصد جدایه‌ها نیز از نظر حضور ژن aac(6′)-Ie/aph(2″) مثبت بودند.

استنتاج: بررسی‌ها نشان داد که در ایزوله MRSA درصد شیوع ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها روبه افزایش است.

واژه‌های کلیدی: ژن mecA، آنزیم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، استافیلوکوک

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های منشاء گرفته از جامعه و بیمارستان است(۱). این باکتری می‌تواند منجر به بروز عفونت‌های مختلفی در بیماران شود. از جمله آن‌ها می‌توان به: سپتی سمی، پنومونی، سپسیس زخم، اندوکاردیت، عفونت‌های وابسته به کاتتر و عفونت مجرای ادراری اشاره نمود(۲). مقاومت

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۴۱۰ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: محمد آهنجان- کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران E-mail: ahanjan2007@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبشناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی اطفال مازندران، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. کارشناسی ارشد میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۲/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱۲/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۶/۱

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

به متی‌سیلین در سوش‌های *استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin resistant Staphylococcus aureus: MRSA)* برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ یعنی تنها چند سال پس از شروع تجویز متی سیلین در انگلستان مشاهده شد، و هم اکنون به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی رایج مطرح می‌باشد(۳). از آن زمان فراوانی ایزوله های مقاوم به متی سیلین دائماً افزایش یافت، به طوری‌که عفونت‌های بیمارستانی گسترده‌ای در نقاط مختلف دنیا در دهه ۱۹۷۰ گزارش شد(۴).

MRSA سویه‌ای از *استافیلوکوک اورئوس* می‌باشد که به یک گروه بزرگ آنتی بیوتیک ها به نام بتالاکتام‌ها، که شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند، مقاوم است. مقاومت به متی‌سیلین نشان دهنده مقاومت به تمامی پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز و سفالوسپورین‌ها می‌باشد(۳). تقریباً به تمام ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین* یک پروتئین متصل به پنی‌سیلین (Penicillin binding protein: PBP) اضافه شده است. که PBP^2a نامیده می‌شود. PBP^2a نسبت به PBP^2 میل ترکیبی بسیار کم‌تری به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد، که هدف اصلی فیزیولوژیکی متی‌سیلین می‌باشد. PBP^2a توسط ژن mecA کد گذاری می‌شود(۵). با گذشت زمان، همراه با گسترش بیشتر ایزوله‌های MRSA، این باکتری‌ها به مرور نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مثل تتراسایکلین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، لینکوزامیدها و سایر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده و درمان عفونت‌ها را مشکل‌تر از گذشته کرده‌اند(۶،۴). آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی یکی از عوامل مهم آنتی باکتریال می‌باشند که برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی به خصوص عفونت‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۷) آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام ها و گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌هایی مانند اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود، کاربرد دارند(۸).

آمینوگلیکوزیدها، این مولکول‌های کاتیونی، با اتصال به زیر واحد s۳۰ ریبوزومی سبب قطع ترجمه باکتری شده و اثرات آنتی باکتریال خود را اعمال می‌کنند(۹). سه مکانیسم مقاومت به آمینو گلیکوزیدها شامل: تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو می‌باشد. در این میان غیر فعالسازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycoside–Modifyng Enzymes: AME) اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت در گونه‌های استافیلوکوکی است. این آنزیم‌ها براساس فعالیت تغییر دهندگیشان به سه رده مختلف طبقه بندی می‌شوند و شامل: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها، (Aminoglycoside-acetyltransferase: AACs) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferase: APHs) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferase: ANTs) هستند. سه آنزیم APH(3′)-III، AAC(6′)/APH(2″) و ANT(4′) که به ترتیب توسط ژن‌های aac(6′)-Ie/aph(2″)، aph(3′)-IIIa و ant(4′)-Ia رمز می‌شوند، جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند(۱۰).

با توجه به اهمیت بیماری‌زایی، شیوع بالای مقاومت به متی سیلین، حضور مداوم و گسترش سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و بالا بودن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در این سویه‌ها و با تاکید بر نقش آمینوگلیکوزیدها در درمان ترکیبی عفونت‌های استافیلوکوکی مطالعه دوره‌ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضرورت دارد. هدف این تحقیق بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و تعیین ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید aac(6′)-Ie/aph(2″) جدا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های زارع ساری، لقمان حکیم و پارس تهران به روش PCR است.

مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری و تشخیص باکتری ها

در این مطالعه مقطعی ۱۷۴ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه‌های بالینی مختلف نظیر زخم، خون، خلط، تراشه، برونش، پلور، کاتتر و ادرار از سه بیمارستان زارع در ساری، لقمان و پارس در تهران طی سال های ۱۳۹۲تا۱۳۹۳ به روش تصادفی جمع‌آوری شد. تمامی سویه ها ابتدا روی محیط مانیتول نمک آگار تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کشت داده شدند و سپس برای تعیین هویت سویه‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کوآگولاز و DNase برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد(۱۱). در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حاوی ۱۵ درصد گلیسرول است و ککشت ذخیره تهیه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تعداد کل ایزوله ها و تفکیک محل نمونه گیری در بیمارستان های مورد مطالعه

محل نمونه بیمارستان	خون	خلط	تراشه	برونش	پلور	ادرار	زخم	کتتر
لقمان تهران	۳	۶	۳۱	۱۱	۶	۱۰	۱۷	۴
پارس تهران	۲	۳	۱۴	۹	۴	۶	۱۰	۲
زارع ساری	-	۲	۱۱	۷	۳	۵	۵	۳
کل	۵	۱۱	۵۶	۲۷	۱۳	۲۱	۳۲	۹

۲-۲- تعیین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA)

برای تعیین استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین ابتدا از روش انتشار دیسک روی آگار استفاده شد. جهت تشخیص فنوتیپی ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از دیسک ۱ میلی گرم اگزاسیلین(OX) و ۳۰ میلی گرم سفوکسیتین (FOX) بر روی محیط مولر هینتون آگار دارای ۴ درصد NaCl طبق توصیه (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards استفاده گردید. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین کم‌تر از ۲۱ میلی‌متر و نسبت به دیسک سفوکسیتین کم‌تر از ۱۳ میلی‌متر بود، نمونه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد(۱۲،۵).

۲-۳- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها

برای تعیین الگوی مقاومتی سویه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین (5 µg)، ونکومایسین (۳۰µg)، تری متوپریم+سولفامتوکسازوت (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۵µg)، اریترومایسین (۱۵µg)، سیپروفلوکسازین (۵µg)، کلیندامایسین (۲µg)، سفازولین (۳۰µg)، دوکسی سیکلین (۳۰µg) و سفوکسیتین (۳۰µg). مطابق روش انتشار از دیسک کربی– بائر با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast, UK) و با رعایت استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) بررسی شد(۱۲،۵).

برای کنترل کیفی دیسک‌ها و پودرهای آنتی‌بیوتیک از سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 و و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 استفاده شد. هم‌چنین از سویه استافیلوکوک اورئوس MRSA 400 (تهیه شده از بانک میکروبی بیمارستان بوعلی تهران) مقاوم به اگزاسیلین برای کنترل مقاومت به اگزاسیلین استفاده گردید(۱۳).

۲-۴- استخراج ژنوم

برای استخراج DNA از سویه‌های استافیلوکوک اورئوس از کیت‌های استخراج DNA (QiaAmp DNA Mini Kit Cat.No: 51304) استفاده شد. مقداری از کلنی ایزوله‌ها به محیط کشت LB براث (Merck, Germany, Cat Number: 11285) تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۲۴ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

و پس از آن سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت. طبق پروتکل کیت بر روی رسوب حاصله ۲۰۰µL از بافر لیزکننده (برای تخلیص بهتر و بیش‌تر DNA از آنزیم لیزواستافین (Sigma, St Louis, USA) نیز استفاده شد) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول‌های ذکر شده در پروتکل الصاقی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس با افزودن اتانول مطلق سرد و سانتریفوژ آن و اضافه نمودن اتانول ۷۰ درصد و بیرون ریختن مواد رویی DNA استخراج شده رسوب کرد. سپس بافر حل کننده به رسوب DNA اضافه و در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. (تمام مراحل در پروتکل الصاقی به‌طور کامل توضیح داده شده).

۲-۵- تایید ژنتیکی ایزوله ها

برای تایید استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین بررسی تمام ایزله‌ها از نظر وجود ژن mecA و با استفاده از PCR که در سال 2009 توسط S.Suhaili و همکاران مورد استفاده قرار گرفته بود(۵) به روش PCR صورت گرفت (جدول شماره ۲). برای اطمینان از درست بودن کار در آزمایش‌های PCR و الکتروفورز از نمونه استاندارد ATCC25923 به‌عنوان کنترل مثبت برای سویه استافیلوکوک اورئوس و هم‌چنین از نمونه استاندارد ATCC700698 به عنوان کنترل مثبت برای سویه های MRSA استفاده شد(۱۴).

۲-۶- واکنش مولکولی PCR

برای تکثیر ژن aac(6′)-Ie/aph(2″) که از شایع‌ترین آنزیم‌های تغییر دهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و سبب غیر فعال سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند و از اهمیت بالینی و درمانی برخوردارند از یک جفت پرایمر اختصاصی (سنتز پرایمر توسط ژن فن آوران ایران) که در سال ۱۹۹۴ توسط Vanhoof و همکاران معرفی شد و توالی آن در جدول شماره ۲ آورده شده، استفاده گردیده است. واکنش PCR برای ۱۷۴ ایزوله MRSA صورت گرفت. نمونه استاندارد ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت برای ژن های مقاومت آمینوکلیکوزیدی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد(۱۵).

جدول شماره ۲: توالی آغازگر های مورد استفاده به همراه اندازه محصولات قطعات PCR

Gene	Perimer Sequencimg	سایز	منابع
*mec*A	5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3' 5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3'	۳۱۰	(۵)
aac(6′)-Ie/aph(2″)	5′CCAAGAGCAATAAGGGCATACC3′ 5′CACACTATCATAACCACTACCG3′	۲۲۲	(۱۸)

مخلوط نهایی واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرومول از هر جفت آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon، ۳ میکرولیتر DNA الگو که با ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس ویال‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Pio Intellectica Canada) قرار گرفت. برنامه دستگاه ترموسایکلر در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: مراحل واکنش PCR برای شناسایی ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و mecA

فاکتور	دما(ºC)		زمان	
ژن مرحله	mecA	aac(6′)-Ie/aph(2″)	mecA	aac(6′)-Ie/aph(2″)
واسرشتگی اولیه	94ºC	94ºC	5 min	5 min
واسرشتگی	94ºC	94ºC	1min	1min
اتصال	57ºC	45ºC	1 min	1 min
تکثیر	72ºC	72ºC	30 s	30 s
تکثیر نهایی	72ºC	72ºC	8min	8min
تعداد سیکل	۳۵	۳۵		

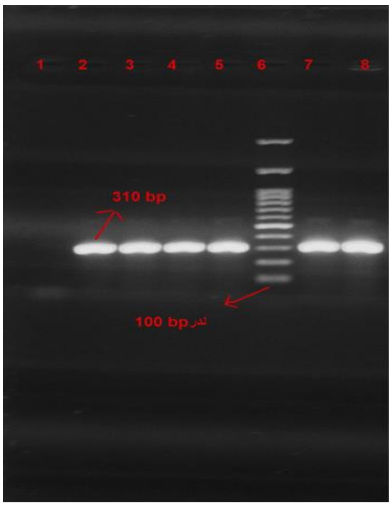
یافته ها

در این بررسی که از بهمن ۱۳۹۲ تا مهر ماه سال ۱۳۹۳ انجام شد ۱۷۴ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از نمونه‌های مختلف بالینی نظیر: خون (۳/۱ درصد)، خلط (۶/۲ درصد)، اگزدای تراشه (۳۱/۹ درصد)، برونش(۱۵/۵ درصد)، پلور(۷/۷ درصد)، کاتتر (۸ درصد) ادرار (۱۲ درصد) و زخم (۱۸/۲ درصد)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

جدا شده از بیمارستان‌های زارع شهر ساری (۲۰/۷ درصد)، لقمان حکیم (۵۰/۵ درصد) و پارس (۲۸/۸ درصد) تهران مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره ۴) نتایج آنتی‌بیوگرام به روش انتشار از دیسک کربی- بائر که ۱۰۰ درصد به سفوکسیتین و اگزاسیلین مقاوم بودند، نشان داد، بالاترین میزان مقاومت در برابر اریترومایسین (۸۵/۱ درصد) و پس از آن بیش‌ترین میزان مقاومت به ترتیب در مقابل کلیندامایسین (۷۷/۶ درصد)، سفازولین (۷۷ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۵/۹ درصد)، ریفامپین (۵۷/۵ درصد)، داکسی سیکلین (۵۵/۲ درصد)و کم‌ترین میزان مقاومت در مقابل کوتریموکسازول (۲۴/۷ درصد) بود. و نیز تمام سویه‌ها به ونکومایسین حساس بودند. هم‌چنین میزان مقاومت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی (۷۴/۱ درصد) مشاهده شد.

در این مطالعه میزان مقاومت چند دارویی بالا بود. به‌طوری که میزان مقاومت به ۳ آنتی بیوتیک ۵/۱ درصد و میزان مقاومت به۷ دارو ۳۷/۹ درصد را نشان داد (جدول شماره ۵و۶). در این مطالعه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR، ۱۷۴ ایزوله برای وجود ژن‌های mecA و aac(6′)-Ie/aph(2″) مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی ایزوله‌ها دارای ژن *mecA* و ۱۳۴ سویه دارای ژن *aac(6′)-Ie/aph(2″)* (۷۷ درصد) بودند.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن mecA (قطعه ۳۱۰ جفت بازی) به وسیله PCR
ردیف ۱: کنترل منفی
ردیف ۲: کنترل مثبت ATCC700698
ردیف ۳-۸: نمونه بالینی
ردیف ۶: لدر bp ۱۰۰

جدول شماره ۴: فراوانی نمونه های جدا شده و تفکیک محل نمونه گیری در ۳ بیمارستان مورد مطالعه

محل نمونه بیمارستان و فراوانی نمونه ها	خون (۳/۱)	خلط (۶/۲)	تراشه (۳۱/۹)	برونش (۱۵/۵)	پلور (۷/۷)	ادرار (۱۲)	زخم (۱۸/۲)	کتتر (۸)
لقمان تهران (۵۰/۵ درصد)	۳	۶	۳۱	۱۱	۶	۱۰	۱۷	۴
پارس تهران (۲۸/۸ درصد)	۲	۳	۱۴	۹	۴	۶	۱۰	۲
زارع ساری (۲۰/۷ درصد)	-	۲	۱۱	۷	۳	۵	۵	۳
کل	۵	۱۱	۵۶	۲۷	۱۳	۲۱	۳۲	۹

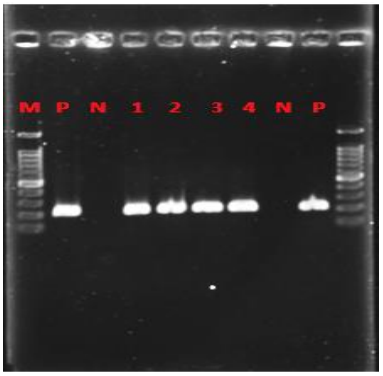
جدول شماره ۵: میزان مقاومت چند دارویی

تعداد آنتی بیوتیک	۷ آنتی بیوتیک تعداد (درصد)	۶ آنتی بیوتیک تعداد (درصد)	۵ آنتی بیوتیک تعداد (درصد)	۴ آنتی بیوتیک تعداد (درصد)	۳ آنتی بیوتیک تعداد (درصد)
تعداد ایزوله های مقاوم	۶۶ (۳۷/۹)	۴۷ (۲۷)	۱۹ (۱۰/۹)	۸ (۴/۵)	۹ (۵/۱)

جدول شماره ۶: میزان مقاومت چند گانه دارویی در ایزوله های جدا شده از بیمارستان های مختلف

مقاومت چندگانه دارویی	درصدکل مقاومت چند گانه تعداد (درصد)	لقمان تعداد (درصد)	پارس تعداد (درصد)	زارع تعداد (درصد)
۳ آنتی بیوتیک	۹ (۵/۱)	۵ (۵۵/۵)	۲ (۲۲/۲)	۲ (۲۲/۲)
۴ آنتی بیوتیک	۸ (۴/۵)	۴ (۵۰)	۱ (۱۲/۵)	۳ (۳۷/۵)
۵ آنتی بیوتیک	۱۹ (۱۰/۹)	۷ (۳۶/۸)	۷ (۳۶/۸)	۵ (۲۶/۳)
۶ آنتی بیوتیک	۴۷ (۲۷)	۲۰ (۴۲/۵)	۱۶ (۳۴)	۱۱ (۲۳/۴)
۷ آنتی بیوتیک	۶۶ (۳۷/۹)	۲۷ (۴۱)	۲۴ (۳۶/۳)	۱۵ (۲۲/۷)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]



تصویر شماره ۲: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن *aac(6′)-Ie/aph(2″)* (قطعه ۲۲۲ جفت بازی) به وسیله PCR
M: لدر ۱۰۰ bp
P: کنترل مثبت ATCC43300
N: کنترل منفی
ردیف ۱ تا ۴: نمونه بالینی

بحث

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به طور فزاینده‌ای در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده است. شناسایی سریع و دقیق MRSA، برای کمک به پزشکان و انتخاب درمان آنتی بیوتیکی مناسب و جلوگیری از گسترش این گونه مورد نیاز است(۱۷). استافیلوکوک اورئوس در طی چند دهه گذشته مبدل به شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی شده است(۱۸، ۱۹). یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت می‌باشد. 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. به عنوان مثال با ورود پنی‌سیلین به بازار و استفاده از این دارو در درمان بیماران بستری به سرعت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ظاهر گشتند(۲۰). مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین به دلیل کسب ژن ترانس‌پپتیداز جدید به نام PBP^2 در استافیلوکوک اورئوس است که تمایل بسیار کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام دارد. ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین mecA است که این ژن برروی کروموزم حمل می‌شود و باعث تبدیل PBP به PBP^2a می‌شود. ژن mecA قسمتی ازیک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی SCCmec است(۵). این عنصر ژنی در گونه‌های حساس به متی‌سیلین وجود ندارد. در ضمن چون منطقه ژنی ذکر شده قدرت جذب دیگر ژن‌های مقاومت را نیز دارد، بنابراین این، اعضاء توانایی لازم برای بقاء و کلونیزه شدن در بیمارستان‌ها را می‌یابند(۲۱).

مطالعه حاظر نشان داد که میزان مقاومت در بیمارستان‌های مورد تحقیق به ۴۳/۵ درصد رسیده است. عواملی که می‌تواند روی شیوع MRSA در کشورهای مختلف موثر باشد شامل سیاست‌های مختلف در اجرای برنامه کنترل عفونت میزان و چگونگی تجویز آنتی‌بیوتیک، جمعیت، نوع یا تایپ سویه غالب و درنهایت به روش مورد استفاده در آزمایشگاه جهت تشخیص استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین بستگی دارد. عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاله‌ای منتشر کردند که در آن شیوع استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین را در کل مقالات منتشر شده در ایران بررسی نمودند. برطبق یافته‌های این تحقیق تاکنون ۲۶۹۰ مقاله و یا خلاصه مقاله در ارتباط با MRSA در ایران منتشر شده است که در این مقاله ۷۴۶۴ نمونه استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی ژنتیکی (mecA) قرار گرفته است. بر طبق تحقیق انجام گرفته شیوع MRSA از ۲۰ تا ۹۰ درصد متفاوت بوده است ولی میانگین شیوع آن در تهران ۵۲ درصد بود(۲۲). بنابر این با توجه به اهمیت بیماری‌زایی و بالا رفتن شیوع مقاومت به متی‌سیلین در سال‌های اخیر، مطالعه دوره‌ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضرورت دارد. در مطالعه ایمان عینی و همکارانش که در سال ۲۰۱۳ روی ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی در تهران انجام شد، ۶۳/۶ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن mecA تشخیص داده شدند(۲۳).

در کشورهای مختلف مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین سویه‌های استافیلوکوک اورئوس رایج می‌باشد. مقاومت به جنتامایسین دارای اهمیت کلینیکی بالایی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

می‌باشد. زیرا می‌تواند با اثرات درمانی این عوامل ضد میکروبی سازش نماید و اغلب در ترکیب با یک بتالاکتام و یا یک گلیکوپپتید به‌ویژه در درمان اندوکاردیت‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۳۴). حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس نسبت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی می‌باشد. گونه‌هایی که ژن aac(6')-Ia/aph(2') را نگهداری می‌کردند کدکننده آنزیم AAC(6')-APH(2') و حتی همه آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به خاطر مقاومت به جنتامایسین مورد توجه قرار گرفتند(۳۵،۳۴،۱۶). در این مطالعه با روش دیسک دیفیوژن مقاومت به جنتامایسین ۷۴/۱ درصد براورد شد و میزان مقاومت به ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* با استفاده از ردیابی ژن توسط روش PCR ۷۷ درصد بود. نتایج مطالعات مختلف در سایر کشور ها نشان داد که ژن aac(6')/aph(2') فرآوان ترین ژن کد کننده آنزیم‌های AME در ایزوله‌های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است(۱۶). هم‌چنین طی مطالعه‌ای که توسط Choi و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره جنوبی انجام شد، نتایج مشابهی به‌دست آمد بدین صورت که ژن aac(6')/aph(2') با فراوانی ۶۵ درصد شایع ترین ژن در میان ایزوله های مورد مطالعه بود و بعد از آن ژن های aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia بترتیب با فراوانی ۴۱ و ۹ درصد شناسایی شدند(۳۲) در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Nurittin و همکارانش صورت گرفت، درصد حضور ژن aac(6')/Aph(2'') در ۶۶ درصد از استافیلوکوک ارئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین مشاهده شد به دنبال آن ژن Ant(4)-Ia و Aph(IIIa) به ترتیب با ۲۴ و ۸ درصد مشاهده شد(۳۶). که مشابه نتیجه به‌دست آمده در مطالعه Choi بود. و در مقابل تحقیقی که Ida و همکارانش در سال ۲۰۰۱ روی ۳۸۱ ایزوله بالینی در ژاپن انجام دادند شیوع ژن Ant(4)-Ia ۸۴/۵ درصد گزارش شد که خیلی بیش‌تر از دو ژن دیگر aac(6')/Aph(2'') ۶۱,۷٪و Aph(IIIa) ۸,۹ درصد بود(۳۸). مطالعه‌ای که عباس یادگار و همکارانش در سال ۱۳۸۸ بر روی ۱۰۰ ایزوله به‌دست آمده در بیمارستان شریعتی و بقیه الله تهران داشتند ۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن ant(4')-Ia مثبت بودند. در تحقیق فوق ژن ant(4')-Ia بیش‌ترین فراوانی را داشت(۱۳). در حالی که در تحقیق حاضر نتایج مشابهی با آن‌چه ارائه شد به‌دست آمد به‌طوری که ژن aac(6')/aph(2') با ۷۷ درصد بیش‌ترین فراوانی را داشت. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد ژن‌های مختلف ایجاد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی می‌توانند در کلون‌های مختلف MRSA در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت باشند(۳۷).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش چشمگیری در شیوع استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین در سطح جهان مشاهده شده است. پیشرفت مقاومت چند گانه به آمینوگلیکوزیدها و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌هایی که MRSA هستند دیده شده. در این مطالعه اهمیت واژه مقاومت به آمینوگلیکوزیدازها و ظهور مقاومت به متی‌سیلین نشان داده شده. و اما سرعت و شیوع پیشرفت مقاومت، وابسته به نحوه مصرف آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌های مناطق مختلف است. و شاید بتوان نتیجه گرفت که ژن aac(6')/aph(2') میزان مقاومت آمینوگلیکوزیدی بیش‌تری را کد میکند. هم‌چنین در مناطق جغرافیایی مثل ایران در استان‌های مختلف ژن‌های متفاوتی ممکن است علت بروز این مقاومت باشند که می‌تواند بیانگر این مساله باشد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خانواده آمینوگلیکوزید و هم‌چنین مدت زمان استفاده در بیماران مختلف شاید به نوعی در بیان مقاومت موثر باشد. در نتیجه سرعت تشخیص عفونت وابسته به MRSA و دیگر ایزوله‌های مشکل ساز بیمارستانی و تشخیص و درمان صحیح و به‌موقع مهم‌ترین امر در اپیدمیولوژی هستند. بنابراین زمانی که درمان عفونت MRSA در بیمارستان‌هایی که امکان انجام مطالعات مولکولی در آن وجود ندارد در حال برنامه ریزی می‌باشد نباید نرخ بالای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را نادیده گرفت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

References

1. Al-Khulaifi Manal M, Amin Aref Nagwa M, Al Salamah AA. Phage typing, PCR amplification for mecA gene, and antibiotic resistance patterns as epidemiologic markers in nosocomial outbreaks of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Saudi J Biol Sci 2009; 16(1): 37-49.
2. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, McTavish SM, Kearns A, Coates A. Combinations of β-lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS One 2015; 10(2): e0117664.
3. Pillai MM, Latha R, Sarkar G. Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction and conventional methods: a comparative study. J Lab Physicians 2012; 4(2): 83-88.
4. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. J Dairy Sci 2007; 90(3): 1176-1185.
5. Suhaili Z, Azmi Johari S, Mohtar M, Rushdi Tan Abdullah A, Ahmad A, Manaf AliJi Y A. Detection of Malaysian methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clinical isolates using simplex and duplex real-time PCR. World J Microbiol Biotechnol 2009; 25: 253-258.
6. Ji Y. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols. Preface. Methods Mol Biol 2007; 391: v.
7. Gade Neeta D. Qazi Mohiuddin Recent trend of aminoglycoside resistance among Staphylococcus aureus isolates in tertiary care hospital. Journal of Laboratory Physicians Materials and Mthods 2014; 6(6): 94-96.
8. Edson R, Terrell C. The aminoglycosides. Mayo.C/in. Proc 1991; 66(1): 158-164.
9. Schmitz F, Fluit C, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999; 43: 253-259.
10. Oyebode A, Terry A, Olusoga D, Bamigboye K, Animasaun D, Oluremi A. Distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes amongst methicillin resistant and methicillin sensitive Staphylococcus aureus isolates from Nigerian hospitals. African Journal of Microbiology Research 2015; 9(5): 318-325.
11. Hadadi A, Moradi-Tabriz H, Mehdipour B, Moslehi B, Esmaielzadeh P. Determining the prevalence of methicillin- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus by MIC and E-Test. Tehran Univ Med J 2011; 69(6): 344-351 (Persian).
12. Clinical Laboratory Standards Institute; Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty first informational supplement CLSI 2011; Vol.31 No1.
13. Yadegar A, Satri M, Mozafari N, Gudarzi Gh. Pervalence ant(4')-Ia gene among nosocomial methicillin resistant Staphylococcus aureus by Multiplex-PCR. Jornal of medicin science Modares 2010; 1: 59-68.
14. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous- DNA-based assays for rapid

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1998; 36(3): 618-623.

15. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin resistant staphylococci. Microbiol Res 2006; 161(1): 49-54.
16. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen H, Eleonora H. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of epidemic phage types. J Med Microbio1 1994; 41: 282-290.
17. 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; 163-168.
18. Havaei SA, Azimian A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Mirab Samiee S, et al. Isolation of Asian endemic and livestock associated clones of methicillin resistant Staphylococcus aureus from ocular samples in Northeastern Iran. Iran J Microbiol 2013; 5: 227-232.
19. Hasani A, Sheikhalizadeh V, Naghili B, Valizadeh V, Nikoonijad AR. Methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus: Appraising therapeutic approaches in the Northwest of Iran. Iran J Microbiol 2013; 5: 56-62.
20. Kikuchi K. Overview and strategy for methicillin resistant bacteria. Jpn J Med Assoc 2002; 127: 347-353.
21. Fateh Manesh P. taeene ekhtesasi Staphylo cuccose ureuse haye moghavem be methicillin az tarighe PCR gene mecA hamgam ba pagohesh haye daneshgahi. Newspaper Resalat 2006; 5960: 19.
22. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderinasab M. Epidemiology of mecA-Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. Iran J Basic Med Sci 2012; 15(5): 1010-1019.
23. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, et al. distribution of genes encoding tetracyclin resistante and aminoglycoside modifying enzymes in Staphylococcus aureuse strains isolated from a burn center. Annals of Burns and Fire Disasters 2013; vol. XXVI n. 2.
24. Sabath LD. Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in strains of Staphylococcus aureus. Ann Intern Med 1982; 97(3): 339-344.
25. Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. Int J Antimicrob Agents 1998; 10(2): 95105.
26. Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(11): 297786.
27. Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycingentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillinresistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(6): 15345.
28. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycosideresistance mechanisms in multidrugresistant Staphylococcus aureus clinical isolates. Curr Microbiol 2008; 56(6): 55862.
29. Wright GD. Aminoglycoside modifying enzymes. Curr Opin Microbiol 1999; 2(5): 499-503.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

30. Brown NM, Reeves DS. Mechanisms and epidemiology of aminoglycoside resistance. J Med Microbiol 1992, 36: 11-14.
31. Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the mec region of the chromosome of Staphylococcus aureus. Plasmid 1994; 31(1): 12-20.
32. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003; 18(5): 631-636.
33. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev 1993; 57(1): 138-163.
34. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. Antimicrob Agent Chemother 1990; 34: 2164-2168.
35. Udo EE, Dashti AA. Detection of genes encoding aminoglycoside- modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. Int J Antimicrob Agent 2000; 13: 273-279.
36. Nurittin A, Baris S, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. Microbiological Research 2006; 161(1): 49-54.
37. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycosidemodifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 311-521.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]