

## Study of Antibiotic Resistance Pattern in Coagulase-negative *Staphylococci* strains Isolated from Clinical Specimens

Yousef Nami<sup>1</sup>, Mehdi Ghiami Rad<sup>2</sup>, Hamid Farah Bakhsh<sup>3</sup>, Nazila Imeni<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Research Institute of Food Biotechnology, Iranian Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research and Extension Organization, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

<sup>3</sup> Laboratory Expert, Ayatollah Hojjat Kouh-Kamri Hospital, Marand, Iran

<sup>4</sup> MSc in Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran

\* **Corresponding Author:** Nazila Imeni, Young Researchers and Elite Club, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran. E-mail: imeni.nazila94@gmail.com

### Abstract

**Received:** 16.05.2018

**Accepted:** 14.08.2018

#### How to Cite this Article:

Nami Y, Ghiami Rad M, Farah Bakhsh H, Imeni N. Study of Antibiotic Resistance Pattern in Coagulase-negative *Staphylococci* strains Isolated from Clinical Specimens. *Avicenna J Clin Med.* 2018; 25(2): 85-91. DOI: 10.21859/ajcm.25.2.85

**Background and Objective:** Due to the emergence and development of antimicrobial resistance in coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS), which is mainly a normal flora of the skin surface and mucous membrane of humans, and the limitation of therapeutic options, this study was aimed to investigate the antibiotic resistance pattern in CoNS strains isolated from clinical specimens.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional descriptive study, a total of 44 isolates of coagulase-negative *staphylococci* were examined from clinical specimens of the patients using standard biochemical methods. Disc diffusion test was utilized to detect resistance to common antibiotics. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was employed to determine the frequency of resistance genes, namely *mecA* and *vanA*.

**Results:** The results of disc diffusion test showed that the isolates had the highest resistance rate to erythromycin as 88.64%; while the lowest resistance rate to meropenem was observed 4.55%. A molecular analysis indicated the presence of 18.18% of the *mecA* gene in the isolates; however no isolates containing *vanA* gene were observed.

**Conclusion:** Considering the frequency of *mecA* gene, results of antibiotic resistance pattern among coagulase-negative *Staphylococci* strains, and lack of any resistance observations to vancomycin by PCR, it is necessary to conduct more precise laboratory methods for the detection of antibiotic resistance to prevent resistance spread in this bacterium.

**Keywords:** Antibiotic Resistance, Coagulase-negative *Staphylococci*, Polymerase Chain Reaction

## بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی جداشده از نمونه‌های بالینی

یوسف نامی<sup>۱</sup>، مهدی قیامی راد<sup>۲</sup>، حمید فرح‌بخش<sup>۳</sup>، نازیلا ایمنی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران  
<sup>۳</sup> کارشناس مسئول آزمایشگاه، بیمارستان آیت‌الله حجت کوه کمری، مرند، ایران  
<sup>۴</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران  
\* نویسنده مسئول: نازیلا ایمنی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران.  
ایمیل: imeni.nazila94@gmail.com

### چکیده

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۷/۰۲/۲۶  
**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۷/۰۵/۲۳

**سابقه و هدف:** به دلیل ظهور و گسترش مقاومت ضد میکروبی در استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی (*Coagulase-negative Staphylococci*) که غالباً جزء فلور طبیعی سطح پوست و غشای مخاطی انسان می‌باشند و از سوی دیگر با توجه به محدودیت گزینه‌های درمانی، مطالعه حاضر به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در CoNS جداشده از نمونه‌های بالینی انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۴۴ جدایه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی از نمونه‌های بالینی بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان آیت‌الله کوه کمری شهر مرند با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی شنا سایی شدند. برای تشخیص مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از روش انتشار از دیسک استفاده گردید. همچنین جهت بررسی فراوانی ژن‌های مقاومت (*mecA* و *vanA*) از روش مولتی‌پلکس PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction) بهره گرفته شد.

**یافته‌ها:** با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مشخص گردید که جدایه‌ها بیشترین مقاومت را نسبت به اریترومایسین (۸۸/۶۴ درصد) دارند؛ در حالی که کمترین مقاومت نسبت به مرونیم (۴/۵۵ درصد) مشاهده شد. از سوی دیگر، بررسی مولکولی نشان‌دهنده حضور ۱۸/۱۸ درصدی ژن *mecA* در جدایه‌ها بود؛ اما هیچ‌کدام از جدایه‌ها حاوی ژن *vanA* نبودند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به فراوانی ژن *mecA* و نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی و نیز عدم مشاهده مقاومت به ونکومایسین با استفاده از روش PCR لازم است از روش‌های دقیق‌تر آزمایشگاهی جهت تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده کرد تا از گسترش مقاومت در این باکتری جلوگیری شود.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس کواگولاز منفی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، واکنش زنجیره پلیمرز

### مقدمه

علاوه بر این، این باکتری‌ها شایع‌ترین و سومین عامل اندوکاردیت عفونی هستند که این امر نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در پزشکی می‌باشد [۱].

بسیاری از گونه‌های CoNS به‌طور معمول مقاوم به عوامل ضد میکروبی که در حال حاضر در برابر عفونت‌های استافیلوکوکوس استفاده می‌شوند، می‌باشند. با این وجود، تبادل ژنتیکی بین CoNS و استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) سبب تبدیل استافیلوکوکوس‌های

استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی جزء فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی انسان هستند. این باکتری‌ها به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب به‌ویژه در محیط‌های بیمارستانی، تأثیر قابل توجهی بر زندگی و سلامت انسان دارند. مطالعات نشان داده‌اند که ۷۵-۵۵ درصد از عفونت‌های بیمارستانی توسط این باکتری‌ها ایجاد می‌شوند. استفاده از پروتز ایمپلنت که در حال حاضر به‌طور مداوم در پزشکی مدرن مورد استفاده قرار می‌گیرد، یکی از عوامل عمده برای ایجاد عفونت‌های CoNS می‌باشد.

مطرح می‌باشند؛ مطالعه حاضر به منظور تعیین الگوی مقاومت دارویی و ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی (*mecA*) و (*vana*) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام شد.

### مواد و روش‌ها

در مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر که در سال ۹۶-۱۳۹۵ در بیمارستان آیت‌الله کوه کمری شهر مرند انجام شد، ۱۳۰ نمونه *استافیلوکوکوس* از نمونه‌های بالینی شامل: خون، ادرار، CSF (Cerebro Spinal Fluid) و زخم مربوط به بیماران بستری و سرپایی طی مدت یک سال جدا گردید. جدایه‌های *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز منفی در آزمایشگاه با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد همچون آزمون کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز لام و لوله‌ای، کشت در محیط مانیتول سالت آگار و مقاومت به دیسک باسیتراکسین طبق روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شناسایی شدند؛ به‌طوری که کلنی‌های اکسیداز منفی و مقاوم به باسیتراکسین از میکروکوکوس‌ها تفکیک گردیدند و به‌عنوان CoNS در نظر گرفته شدند [۸].

در ادامه، حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) و کوتریماکسازول (۲۵ میکروگرم) (BD, United States) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن Kirby-bauer تعیین گردید. در این روش ابتدا یک سو سبازسیون باکتری از کشت ۲۴-۱۸ ساعته با کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه گردید و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) کشت داده شد. سپس، دیسک‌ها با استفاده از یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند و محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از این مدت، قطر هاله‌های عدم رشد براساس دستورالعمل CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) قرائت و ارزیابی شد [۹].

به منظور بررسی وجود ژن‌های مقاومت، ابتدا استخراج DNA ایزوله‌ها با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) در تریس بافر استریل به مدت ۱۸ دقیقه و در سانتیفریوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و مایع رویی به‌عنوان نمونه DNA باکتری مورد استفاده قرار گرفت. سپس جهت تأیید خلوص و غلظت DNA استخراجی، به ترتیب خلوص تمامی نمونه‌ها بین ۲-۱/۸ در نسبت ۲۶۰ A<sub>260</sub> به ۲۸۰ A<sub>280</sub> به دست آمد و غلظت آن‌ها در مقدار ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید.

در ادامه، آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای

غیربیماری‌زا به پاتوژن‌های مهاجم از جمله شیوع گسترده مقاومت به متی‌سیلین در بین گونه‌های CoNS شده است [۲]. یکی از اصلی‌ترین دلایل مقاومت به متی‌سیلین، ژن *mecA* می‌باشد که توسط ترادفی از ژن‌های موجود در ناحیه‌ای از کروموزوم به نام کاست کروموزومی *استافیلوکوکوس* (*mec* SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome) کد می‌گردد. ژن *mecA* در این ناحیه به اندازه ۱/۲ کیلو باز است [۲] و پروتئینی به نام PBP2a (Penicillin-Binding Protein 2a) را کد می‌کند. این پروتئین تمایل کمی به داروهای بتالاکتام داشته و مسئول مقاومت به متی‌سیلین می‌باشد [۴]. سویه‌های *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی مقاوم به متی‌سیلین در بیماران قلبی که از دریچه‌های مصنوعی قلب استفاده می‌کنند، مشکلات فراوانی را ایجاد می‌نمایند. آنتی‌بیوتیک ونکومایسین داروی انتخابی برای درمان اندوکاردیت ناشی از این سویه‌ها می‌باشد [۵]. با این وجود، استفاده مکرر از این دارو موجب تبدیل سویه‌های MRCoNS (Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci) به VRCoNS (Vancomycin Resistant Coagulase Negative Staphylococci) و VICoNS (Intermediate Coagulase Negative Staphylococci) شده است. ونکومایسین با اتصال غیرقابل برگشت به D-آلانین-D-آلانین در پیش‌سازهای پپتیدوگلیکان مانع از ترانس‌گلیکوزیلایسیون و ترانس‌پپتیداسیون در ساخت پپتیدوگلیکان می‌شود و سنتز دیواره در باکتری را مهار می‌نماید. تحقیقات در مورد مقاومت به ونکومایسین نشان می‌دهند که پیش‌سازهای دیواره به‌صورت تغییرشکل‌یافته‌ای سنتز شده است؛ اما میزان آن برای چنین سطح مقاومتی پایین می‌باشد. آنالیز پپتیدوگلیکان در دیواره CoNS بسیار مقاوم، حضور پل‌های عرضی تغییرشکل‌یافته را نسبت به سویه‌های حساس نشان می‌دهد. گزارش شده است که این پل‌های عرضی تغییرشکل‌یافته، اتصال ونکومایسین به پپتیدهای هدف را مهار می‌نماید؛ با این وجود این فرضیه ثابت نشده است [۶].

یکی دیگر از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت نسبت به ونکومایسین، تغییر محل هدف اتصال دارو در دیواره سلولی از طریق انتقال ژنتیکی مقاومت (*vana*) می‌باشد که باعث تغییر D-آلانین-D-آلانین به D-آلانین-D-لاکتات می‌شود [۷].

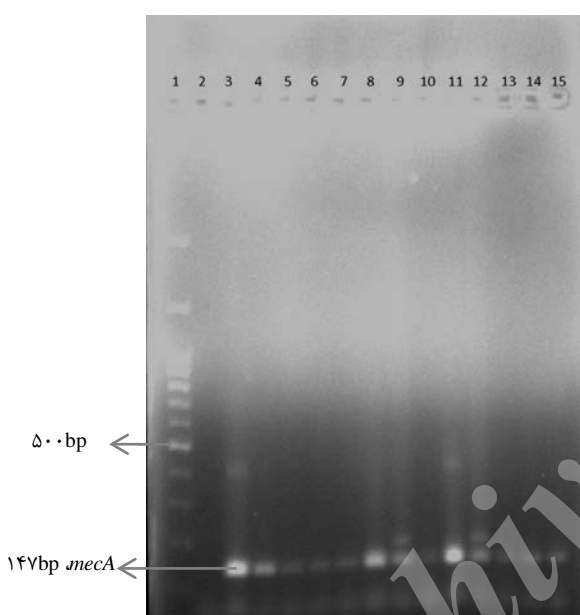
روند رو به رشد *استافیلوکوکوس‌های* مقاوم به عوامل ضد میکروبی از جمله CoNS در سراسر جهان نیازمند سیاست‌های ملی پیشگیری از مقاومت ضد میکروبی و دستورالعمل‌های درمانی جدید می‌باشد. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر مواردی از جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس* با کاهش حساسیت و مقاوم به ونکومایسین و متی‌سیلین از نقاط مختلف ایران و جهان گزارش شده است و نیز اینکه این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروی اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری

درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر (BIORAD, United States) انجام شد. در ادامه، الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۷۵ دقیقه در ولتاژ

واکنش مربوط به ژن‌های *mecA* و *vanA* انجام شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (حاوی Taq پلی مراز، MgCl<sub>2</sub> و dNTP)، ۳ میکرولیتر پرایمر میکس (GENERAY, Korea) از پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱، ۸/۵ میکرولیتر dH<sub>2</sub>O و ۱ میکرولیتر از DNA نمونه بود. برنامه حرارتی شامل: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های *mecA* و *vanA* در جدایه‌ها

منبع	پرایمر (۵'→۳')	اندازه قطعات تکثیر شده	ژن
۱۰	F: 3'-GTGAAGATATACCAAGTGATT-5' R: 5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT-3'	۱۴۷ (bp)	<i>mecA</i>
۱۱	F: 3'-CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-5' R: 5'-CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3'	۱۰۳۰ (bp)	<i>vanA</i>



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن‌های *vanA* و *mecA* با استفاده از روش Multiplex-PCR برای جدایه‌های بالینی و سویه‌های استاندارد

ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۲ سویه استاندارد استروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲ (کنترل منفی برای ژن‌های *mecA* و *vanA*)؛ ستون ۳ سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۳۳۵۹۱ (به‌عنوان کنترل مثبت برای ژن *mecA*)؛ ستون ۶ و ۹ جدایه‌های مثبت می‌باشند.

### بحث

مطالعات جدید نشان می‌دهند که افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروب‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس، مشکلات فراوانی را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها ایجاد کرده است. بدیهی می‌باشد که یکی از نیازهای اساسی برای درمان ضد میکروبی مناسب و جلوگیری از ازدیاد مقاومت در این نوع میکروب‌ها، دانستن الگوی مقاومت دارویی آن‌ها است [۱۰]. بررسی الگوی مقاومت دارویی با استفاده از روش انتشار

۹۰ ولت صورت گرفت و پس از رنگ‌آمیزی ژل با سیف استین، در زیر نور التراویوله بررسی گردید. باید خاطرنشان ساخت که از سویه‌های استاندارد استروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲ به‌عنوان کنترل منفی (حساس به ونکو مایسین)، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۳۳۵۹۱ به‌عنوان کنترل مثبت (مقاوم به متی‌سیلین) و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۹۲۳۱ به‌عنوان کنترل منفی (حساس به متی‌سیلین) استفاده شد و مارکر (۱۰۰bp+۳K) برای تعیین وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

### یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۴۴ جدا یه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی تشخیص داده شد و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت به سفوکسیتین (۲۰/۴۵ درصد)، ونکومایسین (۲۲/۷۳ درصد)، اریترومایسین (۸۸/۶۴ درصد)، سیپروفلوکساسین (۶/۸۲ درصد)، مروپنم (۴/۵۵ درصد) و کوتریماکسازول (۷۵ درصد) به‌دست آمد (جدول ۲).

ارزبایی توزیع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که ژن *mecA* دارای فراوانی ۱۸/۱۸ درصد (۸ جدا یه) می‌باشد؛ اما در هیچ‌کدام از جدایه‌ها ژن مقاومت به ونکومایسین مشاهده نگردید (شکل ۱).

جدول ۲: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های CoNS در مطالعه حاضر (درصد)

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
سفوکسیتین	۷۹/۵۵	-	۲۰/۴۵
ونکومایسین	۷۷/۲۷	-	۲۲/۷۳
اریترومایسین	۱۱/۳۶	-	۸۸/۶۴
سیپروفلوکساسین	۸۸/۶۴	۴/۵۴	۶/۸۲
مروپنم	۹۵/۴۵	-	۴/۵۵
کوتریماکسازول	۲۵	-	۷۵

انتقال ژن مقاومت به دیگر سویه‌های *استافیلوکوکوس* گردد [۱۷]؛ بنابراین علاوه بر مشکلات ایجادشده توسط خود CoNS، مسأله انتقال ژن مقاومت موجب افزایش سویه‌های مقاوم و ایجاد مشکلات درمانی می‌گردد.

در مطالعه حاضر فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های CoNS معادل ۱۸/۱۸ درصد بود که نسبت به بیان فنوتیپی مقاومت به متی‌سیلین (۲۰/۴۵ درصد) کمتر می‌باشد. علت کم‌بودن درصد بیان ژن *mecA* می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های غیروابسته به PBP2a از جمله تولید بیش از حد آنزیم بتالاکتاماز و همچنین تغییر نوع پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBP) باشد که می‌تواند در بیان ژن مقاومت ایفای نقش کند [۱۸].

در مطالعه‌ای که در کشور تونس در مورد *استافیلوکوکوس* کوگولاز منفی انجام شد، میزان ژن *mecA* معادل ۶۵ درصد گزارش گردید [۱۹]. در این راستا، مطالعه‌ای مشابه در تهران نشان داد که ۷۴ درصد از جدایه‌های CoNS دارای ژن *mecA* هستند. مقاومت به متی‌سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن در این مطالعه معادل ۷۲/۹ درصد به‌دست آمد [۲۰]. در پژوهشی دیگر، ۵۲/۵ درصد از جدایه‌های CoNS دارای ژن *mecA* بودند [۲۱]. از سوی دیگر در پژوهشی که توسط دوران و همکاران انجام شد، حضور ژن *mecA* برابر با ۲۹/۶ درصد گزارش گردید. این درحالی است که میزان مقاومت به سفوکسیتین ۱۸/۹ درصد بود [۱۶]. در مطالعه شریعتی و همکاران نیز ۵۲/۳ درصد از جدایه‌های CoNS دارای ژن *mecA* بودند؛ درحالی که با استفاده از روش فنوتیپی، ۵۲/۳ درصد از جدایه‌ها مقاوم به سفوکسیتین گزارش شدند [۱۲]. در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۸ نیز بیان گردید که ۱۷ درصد از جدایه‌ها دارای این ژن می‌باشند [۲۲].

در مطالعات مذکور همانند مطالعه حاضر، میزان مقاومت به سفوکسیتین با روش فنوتیپی و ژنوتیپی همخوانی نداشت. تفاوت در فراوانی ژن *mecA* در مطالعات انجام‌شده ممکن است ناشی از توزیع متفاوت ژن‌ها در مکان‌های گوناگون در جدایه‌های مختلف، روش بیان آن‌ها و متفاوت بودن مکان‌های نمونه‌گیری باشد. همچنین ممکن است در بیان ژنوتیپی مقاومت به متی‌سیلین، عوامل یا ژن‌های دیگر نیز دخیل باشند؛ بنابراین، تجزیه و تحلیل بیشتری در ارتباط با توزیع ژن‌های ایجادکننده مقاومت در این باکتری‌ها مورد نیاز است.

در نقاط مختلف جهان مطالعاتی در مورد پیدایش سویه‌های CoNS مقاوم به ونکومایسین انجام شده است. با وجود اینکه در این مطالعات سویه‌های مقاوم به ونکومایسین گزارش شده‌اند؛ اما این سویه‌ها در ارتباط با ژن‌های مقاومت نبوده‌اند [۲۳]. امروزه در آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی معمول برای تشخیص مقاومت به ونکومایسین از روش انتشار با دیسک به دلیل عدم نیاز به تجهیزات گران استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مشخص گردید که ۲۲/۷۳ درصد از جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین مقاوم هستند؛ اما مشکل موجود

دیسک در مطالعه حاضر نشان داد که مروپنم و سیپروفلوکساسین بالاترین اثر ضد میکروبی را در شرایط آزمایشگاهی بر جدایه‌های CoNS دارند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز به ترتیب نسبت به اریترومایسین (۸۸/۶۴ درصد) و کوتریماکسازول (۷۵ درصد) مشاهده گردید.

در مطالعات دیگر از جمله مطالعه اسکویی و همکاران، آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و ریفامپین بالاترین اثر ضد میکروبی را بر *استافیلوکوکوس*‌های کوگولاز منفی نشان دادند. در این مطالعه بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) گزارش گردید [۱۱]. همچنین در پژوهشی که توسط شریعتی و همکاران انجام شد، بیشترین حساسیت نسبت به ونکومایسین (۱۰۰ درصد) و بالاترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۰ درصد) و کوتریماکسازول (۶۰ درصد) به‌دست آمد [۱]. در این راستا، در مطالعه دیگری بیشترین میزان مقاومت نسبت به اریترومایسین (۶۱/۴ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به افلوکساسین (۳۳ درصد) مشاهده شد [۱۲]. مقادیر حساسیت و مقاومت در مطالعات ذکرشده با مطالعه حاضر اختلاف دارند که این امر عمدتاً می‌تواند ناشی از اختلاف در ناحیه جغرافیایی، زمان مطالعه، بیمارستان‌ها، بخش‌های مورد مطالعه، وضعیت بیماران (بستری و سرپایی) و نوع عفونت باشد.

امروزه برای ارزیابی مقاومت به متی‌سیلین از دیسک‌های اگزاسیلین و سفوکسیتین به دلیل پایداری اثربخشی این آنتی‌بیوتیک‌ها با گذشت زمان و احتمال بالای شناسایی سویه‌های با مقاومت ناهمگون در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی استفاده می‌شود [۱۳].

در مطالعه حاضر با استفاده از دیسک سفوکسیتین، ۲۰/۴۵ درصد از جدایه MRCoNS شناسایی شد. این درحالی است که در مطالعه شریعتی و همکاران ۵۲/۳ درصد از جدایه‌ها مقاوم به سفوکسیتین بودند [۱۲]. در پژوهشی دیگر در اهواز، این میزان معادل ۲۶/۶۷ درصد برآورد گردید [۱۴]. علاوه بر این، در مطالعه‌ای که توسط طهماسبی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در زاهدان انجام شد، میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک معادل ۴۳/۴۳ درصد گزارش گردید [۱۵]. شایان ذکر است در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ توسط دوران و همکاران در ترکیه انجام شد، میزان مقاومت به سفوکسیتین برابر با ۱۸/۹ درصد بود [۱۶].

دلیل تفاوت شیوع MRCoNS در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از وضعیت اقتصادی-اجتماعی مردم، خوددرمانی آنتی‌بیوتیکی، مصرف تجربی و بی‌رویه داروها در جامعه و مرکز درمانی و عدم رعایت کامل مقررات بهداشتی از سوی کارکنان خدمات بهداشتی ناقل این باکتری در برخورد با بیماران و بین کارکنان بیمارستان باشد.

مقاومت به متی‌سیلین اساساً مربوط به بیان ژن *mecA* است. این ژن بر روی کاست کروموزومی *استافیلوکوکوس* (SCCmec) قرار دارد و ممکن است به‌عنوان یک ذخیره بزرگ از این ژن باعث

گفت که زمینه شیوع جدایه‌های مقاوم به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی در حال افزایش می‌باشد. همچنین به دلیل تفاوتی که بین نتایج روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مشاهده گردید، این نتیجه حاصل می‌شود که روش‌های فنوتیپی به‌تنهایی قادر به تشخیص قطعی جدایه‌های مقاوم نمی‌باشند. از سوی دیگر، با توجه به افزایش روزافزون مقاومت در بین این باکتری‌ها لازم است از روش تشخیص دقیق استفاده کرد تا ضمن تجویز داروی مناسب، از گسترش مقاومت جلوگیری گردد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه مصوب مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی ربع رشیدی تبریز می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات کارکنان محترم بخش میکروپشناسی بیمارستان آیت‌الله کوه کمری مرند که در جمع‌آوری ایزوله‌ها با پژوهشگران همکاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌کنند. شایان ذکر است که در این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان و نتایج مطالعه وجود ندارد.

در روش انتشار دیسک ناشی از انتشار ضعیف آنتی‌بیوتیک ونکومايسين در بستر محیط کشت می‌باشد. این روش تنها برای شناسایی سویه‌های VRSA که اندازه هاله آن‌ها برابر با ۶ میلی‌متر می‌باشد، کاربرد دارد [۲۴]. بر این اساس، در مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی سویه‌های مقاوم به ونکومايسين از روش PCR استفاده شد که نتایج حاکی از آن بودند که هیچ‌کدام از جدایه‌ها دارای ژن *vanA* نمی‌باشند.

در این ارتباط در پژوهشی که در هند انجام شد، هیچ‌کدام از ۵۱ جدایه دارای ژن *vanA* نبودند [۲۵]. با این وجود، استفاده غیرمدرانه از این آنتی‌بیوتیک می‌تواند باعث افزایش باکتری‌های مقاوم به ونکومايسين شود؛ بنابراین، برای جلوگیری از گسترش مقاومت در باکتری *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی می‌بایست از تجویز بدون نسخه و استفاده غیرضروری از آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس خودداری نمود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به فراوانی ژن *mecA* و نتایج آزمون انتشار دیسک در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی می‌توان

## REFERENCES

- Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulase-negative Staphylococci and correlation with antibiogram. *Infect Drug Resist.* 2018;11:607-13. PMID: 29731649 DOI: 10.2147/IDR.S159764
- Deyno S, Fekadu S, Seyfe S. Prevalence and antimicrobial resistance of coagulase negative Staphylococci clinical isolates from Ethiopia: a meta-analysis. *BMC Microbiol.* 2018;18(1):43. PMID: 29801462 DOI: 10.1186/s12866-018-1188-6
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Medical microbiology. 26<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2013.
- Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi S, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from nasal cavity in pediatric service. *African J Microbiol Res.* 2013;7(34):4414-21. DOI: 10.5897/AJMR2013.5778
- Hiramatsu K. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(3):147-55. PMID: 11871491 DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00091-3
- Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreaux-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 2006;193(11):1495-503. PMID: 16652276 DOI: 10.1086/503777
- Gilani M, Usman J, Latif M, Munir T, Gill MM, Anjum R, et al. Methicillin resistant coagulase negative staphylococcus: from colonizer to a pathogen. *Pak J Pharm Sci.* 2016;29(4):1117-21. PMID: 27393446
- Hamdan-Partida A, Sainz-Espuntes T, Bustos-Martinez J. Characterization and persistence of Staphylococcus aureus strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1701-5. PMID: 20335416 DOI: 10.1128/JCM.01929-09
- Ferraro MJ. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- Beyene G, Tsegaye W. Bacterial uropathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern in Jimma University specialized hospital, southwest Ethiopia. *Ethiop J Health Sci.* 2011;21(2):141-6. PMID: 22434993
- Oscoui Abdoli S, Ahangarzadeh Rezaei M, Ajang A, Abdinia B. Determination of antibiotic resistance pattern and minimum inhibitory concentration of vancomycin in Staphylococcus aureus and coagulase negative isolated from pediatric clinical samples in Tabriz. *J Ardabil Univ Med Sci.* 2013;13(1):25-34. [Persian]
- Shariati L, Shojapour M, Validi M, Farrokhi E, Tabatabaiefar MA, Karimi A, et al. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2009. *Iran South Med J.* 2011; 14(3):165-72. [Persian]
- Ahmadi SS, Nahaei MR, Amir MN. Sensitivity of staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens against vancomycin by using E-test in Tabriz. *Med J Tabriz Univ Med Sci.* 2002;30(2):17-23.
- Jamshidian M. Methicillin resistance in Staphylococcus strains isolated from clinical samples in Ahwaz. *Med J Tabriz Univ Med Sci.* 2001;35:29-33.
- Tahmasebi H, Bokaeian M, Abadi J. Phenotypic and molecular study of beta-lactam resistance in coagulase-negative Staphylococci samples. *Pars J Med Sci.* 2016; 14(1):55-63. [Persian]
- Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in Staphylococci. *Indian J Med Res.* 2012;135:389-96. PMID: 22561627
- Rosenthal ME, Dever LL, Moucha CS, Chavda KD, Otto M, Kreiswirth BN. Molecular characterization of an early invasive Staphylococcus epidermidis prosthetic joint infection. *Microb Drug Resist.* 2011;17(3):345-50. PMID: 21510745 DOI: 10.1089/mdr.2010.0157
- 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):631-6. PMID: 14555812 DOI: 10.3346/jkms.2003.18.5.631
- Bouchami O, Achour W, Hassen AB. Species distribution and antibiotic sensitivity pattern of coagulase-negative Staphylococci other than Staphylococcus epidermidis isolated from various clinical specimens. *Afr J Microbiol Res.* 2011;5(11):1298-305. DOI: 5897/AJMR11.112
- Mirsalehian A, JabalAmeli F, Kazemi B, Alizadeh SA.

- Comparison of disk diffusion method with polymerase chain reaction for detecting methicillin resistance in clinical isolates of Staphylococci. *Tehran Univ Med J.* 2003; **61**(6):420-5. [Persian]
21. Nafisi M, Kalhor H, Zamanzad B, Karimi A, Farokhi A, Validi M. Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-Kord. *Arak Univ Med Sci J.* 2008; **11**(2):94-101. [Persian]
  22. Nobrega DB, Naushad S, Naqvi SA, Condas LA, Saini V, Kastelic JP, et al. Prevalence and genetic basis of antimicrobial resistance in non-aureus Staphylococci isolated from Canadian dairy herds. *Front Microbiol.* 2018;**9**:256. PMID: 29503642 DOI: 10.3389/fmicb.2018.00256
  23. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.* 2006;**42**:S25-34. PMID: 16323116 DOI: 10.1086/491711
  24. Jones RN. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect re-sistant strains. *Clin Infect Dis.* 2006;**42**(1):S13-24. PMID: 16323115 DOI: 10.1086/491710
  25. Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant Staphylococcus aureus (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis.* 2006;**6**:156. PMID: 17067393 DOI: 10.1186/1471-2334-6-156

Archive of SID