Archive of SID

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۲، شماره ۱: از ۵۹-۶۸
بهار ۱۳۸۸

بررسی شیوع ژن *ant(4')-Ia* در میان ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش Multiplex-PCR

عباس یادگار[۱]، مرتضی ستاری[۲*]، نورامیر مظفری[۳]، غلامرضا گودرزی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۶

چکیده

هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتریسیدال قدرتمندی هستند که اغلب به‌صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها به‌خصوص در درمان اندوکاردیت استافیلوکوکی مصرف می‌شوند. غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو توسط آنزیم‌های سلولی تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در استافیلوکوک‌ها است.

هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن *ant(4')-Ia* کدکننده یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن *mecA* که موجب مقاومت به متی‌سیلین می‌شود، به‌طور همزمان به روش Multiplex-PCR در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۱۰۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان‌های شریعتی و بقیه‌الله تهران، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به روش انتشار از دیسک توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین، اگزاسیلین، ونکومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، جنتامیسین، توبرامایسین، آمیکاسین، نتیل‌مایسین و کانامایسین با رعایت اصول CLSI تعیین شد. همچنین توسط روش رقیق‌سازی در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از پودر آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، جنتامیسین، توبرامایسین و آمیکاسین تعیین شد. برای تشخیص ژن‌های مقاومت *ant(4')-Ia* و *mecA* از دو جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد و با استفاده از روش Multiplex-PCR فراوانی آن‌ها تعیین شد.

نتایج: تمامی سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند (۱۰۰ درصد) و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب در مقابل کانامایسین (۶۸ درصد)، تتراسایکلین (۶۱ درصد)، اریترومایسین (۵۶ درصد)، توبرامایسین (۵۳ درصد)، جنتامیسین (۵۲ درصد)، آمیکاسین و اگزاسیلین (۴۸ درصد) و نتیل‌مایسین (۲۲ درصد) مشاهده شد. همچنین تمامی سویه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۰۰ درصد). در روش رقیق‌سازی در آگار ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و ۴۹ درصد، ۴۵ درصد و ۵۱ درصد سویه‌ها نیز به‌ترتیب نسبت به جنتامیسین، آمیکاسین و توبرامایسین مقاومت نشان دادند. همچنین ۳۷ درصد سویه‌ها مقاومت سطح بالا نسبت به جنتامیسین با حداقل غلظت مهاری ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند. در روش Multiplex-PCR ۵۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند و ۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن *ant(4')-Ia* مثبت بودند.

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۱۵۸-۱۴۱۱۵
Email: sattarim@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده توسط آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند که ارتباط معناداری از نظر آماری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین وجود دارد (P<۰/۰۵).

کلیدواژگان: استافیلوکوکوس اورئوس، *mecA*، مقاومت آمینوگلیکوزیدی، روش Multiplex-PCR

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) به روشنی به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها (Beta lactam)، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها (Tetracycline)، فلوروکوئینولون‌ها (Fluoroquinolones) و ماکرولیدها (Macrolides) کسب کرده است. بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین (Vancomycin) و تیکوپلانین (Teicoplanine) در دسترس هستند. مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها به دلیل تولید بیش از حد PBP2a است که یک پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin-Binding Protein: PBP) تغییر یافته است و تمایل کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام نشان می‌دهد [۱-٤].

آمینوگلیکوزیدها اغلب به‌صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک‌ها (*Enterococcus*) و استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود کاربرد دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به زیرواحد ریبوزومی ۳۰S باعث تداخل در سنتز پروتئین‌های سلول باکتری می‌شوند [۵]. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در گرم مثبت‌ها گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند. در این میان غیرفعال‌سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینو-گلیکوزیدها (Aminoglycoside-modifying enzymes: AMEs)، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در گونه‌های استافیلوکوکی است. این آنزیم‌ها به سه رده مختلف براساس فعالیت تغییردهندگی‌شان طبقه‌بندی می‌شوند که شامل آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها AACs (Aminoglycoside-acetyltransferases) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها APHs (Aminoglycoside-phosphotransferases) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها ANTs (Aminoglycoside-nucleotidyltransferases) هستند [٦- ۹].

در میان کوکسی‌های گرم مثبتی چون استافیلوکوک‌ها، انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها (*Streptococcus*) پنج نوع از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. از این میان سه آنزیم AAC(6′)/APH(2″)، ANT(4′)-I و APH(3′)-III که به‌ترتیب توسط ژن‌های *aac(6')-Ie/aph(2")*، *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa* کد می‌شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا آن‌ها جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و علاوه بر این باعث غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند [۱۰-۱۳].

هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن *ant(4')-Ia* کدکننده یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن *mecA* که موجب مقاومت به متی‌سیلین می‌شود، به‌طور همزمان به روش Multiplex-PCR در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی است. همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

الگوهای مقاومتی به‌دست آمده نسبت به آمینوگلیکوزیدها و متی‌سیلین توسط روش‌های استاندارد تعیین حساسیت ضد میکروبی نظیر انتشار از دیسک و روش رقت در آگار با نتایج حاصل از روش مولکولی PCR مقایسه و بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و تشخیص باکتری‌ها

صد سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی مختلف نظیر زخم، آبسه، خلط، خون، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل از دو بیمارستان شریعتی و بقیه‌الله در تهران طی سال‌های ۱۳۸٦ تا ۱۳۸۷به روش تصادفی جمع‌آوری شد. تمامی سویه‌ها ابتدا روی محیط مانیتول نمک آگار (Manitol Salt agar) 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 (Coagulase) و DNase برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد [١٤]. در تمام آزمایش‌های باکتری‌شناسی از دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermis*) ATCC 12228 موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده شد. در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy Broth: TSB) تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حاوی ۱۵ درصد گلیسرول استوک (Glycerol stock) کشت ذخیره تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها

برای تعیین الگوی مقاومتی سویه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین (Oxacillin) (۱ میکروگرم)، پنی‌سیلین G (۱۰ واحد)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (Erythromycin) (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و آمینوگلیکوزیدها شامل جنتامیسین (Gentamicin) (۱۰ میکرگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم)، نتیل‌مایسین (Netilmicin) (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (Tobramycin) (۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (Kanamycin) (۳۰ میکروگرم) مطابق روش انتشار از دیسک کربی- بائر (Kirby-Bauer Disk diffusion method) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast, UK) و با رعایت استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) بررسی شد [۱۵]. همچنین حداقل غلظت مهاری (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، جنتامیسین، آمیکاسین و توبرامایسین به روش رقیق‌سازی در آگار (Agar dilution method) با استفاده از پودرهای آنتی‌بیوتیک‌های مذکور (Sigma, St Louis, USA) تعیین شد. به این صورت که محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) (Muller Hinton agar) حاوی رقت‌های متوالی از صفر تا بیش از ۱۰۲٤ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های فوق تهیه شد. سپس یک میکرولیتر از اینوکلوم (Inoculum) باکتریایی با غلظت نهایی 10^4 cfu/spot (Colony-forming unit/spot) به هر کدام از رقت‌ها به روش نقطه‌ای تلقیح شد. همچنین برای تعیین MIC برای اگزاسیلین محیط مولر هینتون حاوی ۲/۵ درصد کلرور سدیم (NaCl) تهیه شد [۱۵].

برای کنترل کیفی دیسک‌ها و پودرهای آنتی‌بیوتیک از سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 و انتروکوکوس فکالیس (*Entrococcus faecalis*) ATCC 29212 (موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران) استفاده شد. همچنین از سویه استافیلوکوکوس اورئوس MRSA 400 (تهیه شده از بانک میکروبی بیمارستان بوعلی تهران) مقاوم به اگزاسیلین برای کنترل مقاومت به اگزاسیلین و از سویه انتروکوکوس فکالیس JH2-2 (اهدایی از طرف جناب آقای دکتر محمد فیض آبادی، آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران) که علاوه بر مقاومت نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

به ریفامپیسین (Rifampicin) و فوزیدیک اسید (Fusidic acid) نسبت به آمینوگلیکوزیدها نیز مقاوم است، برای کنترل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها استفاده شد.

۲-۳- استخراج ژنوم

برای استخراج DNA از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کیت‌های استخراج DNA (DNPTM Kit) تهیه شده از شرکت CinnaGen استفاده شد. همچنین برای تخلیص بهتر و بیشتر DNA از آنزیم لیزواستافین (Lysostaphin) (Sigma, St Louis, USA) نیز استفاده شد.

۲-٤- واکنش Multiplex-PCR

برای تکثیر ژن‌های *ant(4')-Ia* و *mecA* از دو جفت آغازگر (Primer) اختصاصی که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی (Choi) و همکاران طراحی شد، استفاده گردید [۱۳]. توالی آغازگرها و اندازه قطعات محصول در جدول ۱ آمده است. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱x، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (CinnaGen) بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient, Eppendrof, Germany) نیز به این صورت تنظیم شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و بعد از آن ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه.

در واکنش‌های PCR از DNA الگو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به‌عنوان کنترل منفی و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس MRSA 400 (دارای ژن‌های *mecA* و *ant(4')-Ia*) و انتروکوکوس فکالیس JH2-2 (دارای ژن *ant(4')-Ia*) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده به همراه اندازه قطعات محصول PCR

ژن	توالی	*	**	مرجع
mecA	جلویی ś-CCTAGTAAAGCTCCGGAA-ź	۱۷	۳۱٤	۱۳
	برگشتی ś-CTAGTCCATTCGGTCCA-ź	۱۸		
ant(4')-Ia	جلویی ś-AATCGGTAGAAGCCCAA-ź	۱۷	۱۳۵	۱۳
	برگشتی ś-GCACCTGCCATTGCTA-ź	۱٦		

* تعداد نوکلئوتید

** طول قطعه محصول (جفت‌باز)

محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز (وزنی به حجمی: W/V) حاوی ۰/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) از یکدیگر جدا شدند و سپس در زیر نور ماورای بنفش (Ultra violet: UV) در طول موج ۲٦۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور (Transilluminator) مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگر (Marker) مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (GeneRuler^{TM}, Fermentas) استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک (BioDocAnalyse, Biometra) عکس‌برداری شد.

۲-۵- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵ برنامه ویندوز) و نرم‌افزار Excel 2007 (Microsoft Office) و آزمون آماری χ^2 انجام گرفت و P-value <۰/۰۵ از نظر آماری با اهمیت و معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاومت (۱۰۰ درصد) دارند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به‌ترتیب

www.SID.ir

Archive of SID

در مقابل کانامایسین (۶۸ درصد)، تتراسایکلین (۶۱ درصد)، اریترومایسین (۵۶ درصد)، توبرامایسین (۵۳ درصد)، جنتامیسین (۵۲ درصد)، آمیکاسین و اگزاسیلین (۴۸ درصد) و نتیل‌مایسین (۲۲ درصد) مشاهده شد. همچنین تمامی سویه‌ها نسبت به ونکومایسین حساسیت (۱۰۰ درصد) نشان دادند. در خصوص مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی از میان کل سویه‌های بررسی شده، ۷۱ سویه (۷۱ درصد سویه‌ها) حداقل نسبت به یکی از آمینوگلیکوزیدهای مورد آزمایش در روش انتشار از دیسک مقاومت نشان دادند. بیشترین میزان مقاومت نسبت به کانامایسین (۶۸ درصد) و کمترین میزان مقاومت نیز نسبت به نتیل‌مایسین (۲۲ درصد) مشاهده شد.

از میان ۱۰۰ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی در روش انتشار از دیسک ۴۸ سویه نسبت به متی‌سیلین مقاوم و ۵۲ سویه نیز حساس بودند. به‌طور کلی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشتری در سویه‌های MRSA نسبت به سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*: MSSA) مشاهده شد (جدول ۲).

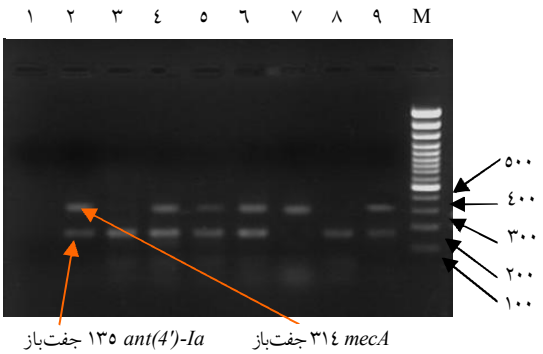
نتایج تعیین MIC به روش رقیق‌سازی در آگار نشان داد که ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاوم (MRSA) و ۵۰ درصد حساس (MSSA) بودند و ۴۹ درصد، ۴۵ درصد و ۵۱ درصد سویه‌ها نیز به‌ترتیب نسبت به جنتامیسین، آمیکاسین و توبرامایسین مقاومت نشان دادند. همچنین ۳۷ درصد سویه‌ها فنوتیپ مقاومت سطح بالا نسبت به جنتامیسین (High-Level Gentamicin Resistance: HLGR) با MIC بیشتر یا مساوی ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند که از بین ۵ درصد سویه‌ها MIC برابر ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۱۶ درصد سویه‌ها MIC برابر ۲۵۶ میکرگرم در میلی‌لیتر، ۸ درصد سویه‌ها MIC برابر ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۷ درصد سویه‌ها MIC برابر ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱ درصد سویه‌ها نیز MIC بیشتر از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند که این سویه به تمام آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به‌علاوه سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش به غیر از ونکومایسین مقاوم بود. همچنین تمامی سویه‌های با فنوتیپ HLGR نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند.

جدول ۲ ارتباط درصد فراوانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی با مقاومت به متی‌سیلین به روش انتشار از دیسک

آنتی‌بیوتیک	نوع نمونه برحسب تعداد (درصد)		جمع کل (درصد)
	MSSA: ۵۲ (درصد)	MRSA: ۴۸ (درصد)	
PG[1] (۱۰ واحد)	۵۲ (۱۰۰)	۴۸ (۱۰۰)	۱۰۰ (۱۰۰)
OX[2] (۱ میکروگرم)	۰ (۰)	۴۸ (۱۰۰)	۴۸ (۴۸)
VA[3] (۳۰ میکروگرم)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
E[4] (۱۵ میکروگرم)	۱۹ (۳۶/۵۳)	۳۷ (۷۷/۰۸)	۵۶ (۵۶)
T[5] (۳۰ میکروگرم)	۲۲ (۴۲/۳۰)	۳۹ (۸۱/۲۵)	۶۱ (۶۱)
GM[6] (۱۰ میکروگرم)	۷ (۱۳/۴۶)	۴۵ (۹۳/۷۵)	۵۲ (۵۲)
AK[7] (۳۰ میکروگرم)	۲ (۳/۸۴)	۴۶ (۹۵/۸۳)	۴۸ (۴۸)
NT[8] (۳۰ میکروگرم)	۳ (۵/۷۶)	۱۹ (۳۹/۵۸)	۲۲ (۲۲)
TN[9] (۱۰ میکروگرم)	۱۶ (۳۰/۷۶)	۳۷ (۷۷/۰۸)	۵۳ (۵۳)
K[10] (۳۰ میکروگرم)	۲۲ (۴۲/۳۰)	۴۶ (۹۵/۸۳)	۶۸ (۶۸)

۱: پنی‌سیلین، **۲:** اگزاسیلین، **۳:** ونکومایسین، **۴:** اریترومایسین، **۵:** تتراسایکلین، **۶:** جنتامیسین، **۷:** آمیکاسین، **۸:** نتیل‌مایسین، **۹:** توبرامایسین، **۱۰:** کانامایسین

فراوانی ژن‌های *mecA* و *ant(4')-Ia* برای تمام سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس به روش Multiplex-PCR تعیین شد. بر طبق نتایج حاصل ۵۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA* بوده و ۴۷ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور این ژن منفی بودند. ژن *ant(4')-Ia* نیز در ۵۸ درصد سویه‌ها شناسایی شد. طول قطعات تکثیریافته به‌ترتیب برای ژن‌های *mecA* و *ant(4')-Ia*، ۳۱۴ و ۱۳۵ جفت‌باز است که در شکل ۱ مشاهده می‌شوند.



شکل ۱ ستون M: سایز نشانگر 100 bp Plus، **ستون ۱:** کنترل منفی، **ستون ۲:** سویه استافیلوکوکوس اورئوس MRSA 400 به‌عنوان کنترل مثبت، **ستون ۳:** سویه انتروکوکوس فکالیس JH2-2 به‌عنوان کنترل مثبت، **ستون‌های ۴- ۹:** سویه‌های بالینی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ ارتباط بین حضور ژن‌های *ant(4')-Ia* و *mecA* با فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی

فنوتیپ مقاومت a	*ant(4')-Ia*	*mecA*
K ،TN ،N ،AK ،GM	+	+
K ،TN ،AK ،GM	+	+
K ،TN ،N ،GM	+	+
K ،TN ،GM	+	+
K ،TN ،AK	+	+
K ،TN	+	–
K	–	+
TN	–	–
K	–	–

(+): حضور ژن
(–): عدم حضور ژن

در جدول ۳ ارتباط بین حضور ژن‌های *mecA* و *ant(4')-Ia* و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده می‌شود. در جدول ٤ نیز درصد فراوانی ژن *ant(4')-Ia* و ژن *mecA* تعیین شده به روش Multiplex-PCR با مقاومت به متی‌سیلین به روش رقیق‌سازی در آگار مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ژن *ant(4')-Ia* در ۸۸ درصد سویه‌های MRSA وجود دارد در حالی که ۲۸ درصد سویه‌های MSSA از نظر حضور این ژن مثبت بودند.

جدول ٤ مقایسه فراوانی ژن *ant(4')-Ia* و ژن *mecA* با مقاومت به متی‌سیلین به روش رقیق‌سازی در آگار

نوع ژن مقاومت	نوع نمونه برحسب تعداد (درصد)		جمع کل (درصد)
	MSSA: ۵۰ (درصد)	MRSA: ۵۰ (درصد)	
ant(4')-Ia	۱٤ (۲۸)	٤٤ (۸۸)	۵۸ (۵۸)
mecA	٤ (۸)	٤۹ (۹۸)	۵۳ (۵۳)

٤- بحث

مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس اکتساب ژن کدکننده یک آنزیم ترانس‌پپتیداز (PBP) جدید است که تمایل کاهش‌یافته‌ای برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین *mecA* است که این ژن روی کروموزوم سویه‌های MRSA حمل می‌شود. این ژن یک PBP تغییریافته و با تمایل کم برای اتصال به بتالاکتام‌ها به نام PBP2a یا PBP2́ را کد می‌کند. ژن *mecA* بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*: SCC*mec*) است [۱٦- ۲۰]. از آن‌جا که ژن *mecA* هومولوژی سطح بالایی در میان سویه‌های MRSA و استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci: MRCNS) دارد؛ بنابراین این ژن به‌عنوان یک شاخص مولکولی مناسب برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین در تمام گونه‌های استافیلوکوکی توصیف شده است [۲۱، ۲۲].

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت‌های جدی استافیلوکوکی با ارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌ها بازی می‌کنند. این آنتی‌بیوتیک‌ها از ویژگی‌های متعددی برخوردارند و به‌همین دلیل از آن‌ها به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی مفید و با ارزش یاد می‌کنند. از میان این ویژگی‌ها می‌توان به فعالیت باکتریسیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی‌بیوتیک (Post-antibiotic effect: PAE) و آثار هم‌افزایی آن‌ها با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها همچون بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد [۲۳- ۲٦]. معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک‌ها تغییر و اصلاح آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها است به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم نیستند. ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها یا روی پلاسمیدها (پلاسمیدهای مقاومت به جنتامیسین، نئومایسین (Neomycin) و کانامایسین) یا روی کروموزوم قرار دارند [۲۷- ۳۰].

میزان مقاومت در برابر اگزاسیلین در آزمایش تعیین MIC به روش رقیق‌سازی در آگار دو درصد بیشتر از آزمایش انتشار

www.SID.ir

Archive of SID

از دیسک (۵۰ درصد در مقابل ٤٨ درصد) است. در خصوص آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی میزان مقاومت در آزمایش تعیین MIC به روش رقیق‌سازی در آگار به‌طور کلی کمتر از نتایج آزمایش انتشار از دیسک است. تمامی سویه‌های با فنوتیپ HLGR (MIC ≥ ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند و به‌طور کلی در سویه‌های MRSA در مقایسه با سویه‌های MSSA مقاومت بالاتری نسبت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده می‌شود. از نظر آماری نیز ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده می‌شود (P-value <۰/۰۵).

در مطالعه حاضر ۵۳ درصد سویه‌ها از نظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند در حالی‌که در روش‌های فنوتیپی انتشار از دیسک و رقیق‌سازی در آگار به‌ترتیب ٤٨ درصد و ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند. از بین ۵۳ سویه $mecA^+$ چهار سویه در روش رقیق‌سازی در آگار نسبت به اگزاسیلین حساسیت نشان دادند. در چنین مواردی که سویه $mecA^+$ بوده ولی در روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت نسبت به اگزاسیلین حساس است علت این است که ژن *mecA* به‌طور دائم بیان نمی‌شود و ژن‌های جانبی ویژه‌ای همچون ژن *femA* و *mecR* ممکن است در بیان آن نقش داشته باشند یا این که ژن سرکوب‌شده *mecA* به روش PCR تکثیر شود [١٦]. همچنین از بین ٤٧ سویه $mecA^-$ یک سویه در روش رقیق‌سازی در آگار به اگزاسیلین مقاوم بود. در چنین مواردی مقاومت به تولید بیش از حد آنزیم بتالاکتاماز یا وجود PBP دیگری به غیر از PBP2a یا PBP2́ که توسط ژنی غیر از ژن *mecA* کد می‌شوند، نسبت داده می‌شود [١٦]. با وجود چنین اختلافات جزئی امروزه از روش PCR به‌عنوان استاندارد طلایی در تشخیص سویه‌های MRSA نام برده می‌شود [٢١].

۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن *ant(4′)-Ia* مثبت بودند. یکی از دلایل بالا بودن شیوع ژن *ant(4′)-Ia* در این مطالعه این است که این ژن در نزدیکی ژن *mecA* قرار دارد و در این مطالعه نیز ۵۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند [١٢]. مقاومت به نئومایسین، توبرامایسین، آمیکاسین، جنتامیسین و کانامایسین در استافیلوکوک‌ها توسط آنزیم ANT(4′)-I که به‌وسیله ژن *ant(4′)-Ia* کد می‌شود واسطه‌گری می‌شود. این ژن اغلب روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگاتیوی (Conjugative) مانند pSK41 و در نهایت درون منطقه *mec* از کروموزوم سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که احتمالاً نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه‌گری شده توسط IS257 (IS257-mediated recombination events) است، الحاق می‌شوند [٣١]. پلاسمید pUB110 که ژن *ant(4′)-Ia* را حمل می‌کند درون SCC*mec* II الحاق شده است، همچنین پلاسمیدهای الحاقی حمل‌کننده ترانسپوزون (Transposone) Tn4001 که کدکننده ژن *aac(6′)-Ie/aph(2″)* هستند در SCC*mec* IVc گزارش شده‌اند [٣٢]. مطالعات متعددی ارتباط بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و مقاومت به متی‌سیلین را نشان داده‌اند [١٢، ١٣، ٢١، ٣٣]. در این مطالعه نیز ارتباط آشکاری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده شد.

ژن *ant(4′)-Ia* در ۸۸ درصد سویه‌های MRSA مشاهده شد در حالی‌که ۲۸ درصد سویه‌های MSSA از نظر حضور این ژن مثبت بودند. همچنین از نظر آماری ارتباط معناداری بین حضور ژن *ant(4′)-Ia* و مقاومت به آمیکاسین مشاهده شد (P-value <۰/۰۵). تعداد معدودی از سویه‌ها در روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به توبرامایسین و کانامایسین مقاومت نشان دادند؛ در حالی‌که فاقد ژن *ant(4′)-Ia* بودند. در چنین مواردی احتمالاً مقاومت به دلیل حضور دیگر ژن‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی یا مکانیسم‌های دیگری همچون کاهش نفوذپذیری دارو یا تغییر اهداف ریبوزومی است.

نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داد که ژن *aac(6′)-Ie/aph(2″)* فراوان‌ترین ژن کدکننده آنزیم‌های AME

www.SID.ir

Archive of SID

در سویه‌های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است [۱۲، ۲۱]. همچنین طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی و همکاران در کره انجام شد نتایج مشابهی به‌دست آمد به این صورت که ژن *aac(6')-Ie/aph(2")* با فراوانی ٦٥ درصد شایع‌ترین ژن در میان ایزوله‌های مورد مطالعه بوده و بعد از آن ژن‌های *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa* به‌ترتیب با فراوانی ٤١ درصد و ۹ درصد شناسایی شدند [۱۳]. در سال ۲۰۰۱ ایدا (Ida) و همکاران طی تحقیقی که در ژاپن انجام دادند نتایجی متفاوت با آن‌چه که در کشورهای اروپایی به‌دست آمده بود، گرفتند. در این بررسی ژن *ant(4')-Ia* با فراوانی ٨٤/٥ درصد بیشترین شیوع را داشت و ژن‌های *aac(6')-Ie/aph(2")* و *aph(3')-IIIa* هر کدام به‌ترتیب با فراوانی ٦١/٧ درصد و ٨/٩ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند [۱۲].

طی مطالعه‌ای که توسط فتح‌الله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در داخل کشور انجام شد، میزان مقاومت ۱۰۹ ایزوله MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به روش انتشار از دیسک بررسی شد. در این مطالعه ۹۷ درصد سویه‌ها مقاوم به کانامایسین، ۹٦ درصد مقاوم به توبرامایسین، ۸۷ درصد مقاوم به جنتامیسین، ۹۳ درصد مقاوم به آمیکاسین و ۸۰ درصد مقاوم به نتیل‌مایسین گزارش شدند. همچنین در این بررسی با استفاده از روش PCR فراوانی ژن‌های AME تعیین و به این صورت گزارش شد که ژن *aac(6')-Ie/aph(2")* با فراوانی ۸۳ درصد دارای بیشترین شیوع و پس از آن ژن‌های *aph(3')-IIIa* و *ant(4')-Ia* هر کدام به‌ترتیب با فراوانی ۷۱ و ۲٦ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند [٣٤]. یکی از دلایل اصلی بالا بودن سطح مقاومت در این بررسی نسبت به مطالعه حاضر این است که این محققان مقاومت آمینوگلیکوزیدی را تنها روی سویه‌های MRSA بررسی و گزارش کرده‌اند؛ در حالی‌که در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس اعم از MRSA و MSSA بررسی شد.

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها و افزایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به‌نظر می‌رسد. همان‌طور که اشاره شد مطالعات مختلفی ارتباط بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را در سویه‌های MRSA تأیید می‌کنند. در مطالعه حاضر نیز چنین ارتباطی به وضوح مشاهده می‌شود. بنابراین شناسایی سریع و همزمان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های AME به همراه ژن *mecA* با استفاده از روش Multiplex-PCR از مزیت‌های ویژه‌ای برخوردار است، زیرا با استفاده از این روش که تکنیکی سریع و قابل اعتماد است، می‌توان چندین ژن مقاومت را به‌طور همزمان طی یک واکنش و در کمتر از ٦ ساعت شناسایی کرد.

٥- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته باکتری‌شناسی پزشکی انجام شده است. همچنین بدین وسیله از استاد گرامی جناب آقای دکتر محمدمهدی فیض‌آبادی به دلیل اهدای سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس JH2-2 تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Novick PR, Schelievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect 2001; 3(7): 585-94.

[2] Konno M. Nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Infect Chemother 1995; 1(1): 30-9.

www.SID.ir

Archive of SID

[3] Warsa CW, Okubo T, Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of Staphylococcus aureus clinical isolates in Indonesia. J Infect Chemother 1996; 2: 29-33.

[4] Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest 2003; 111(9): 1265-73.

[5] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003; 16(3): 430-50.

[6] Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1003-12.

[7] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(4): 727-37.

[8] Arya DP. Aminoglycoside Antibiotics, From Chemical Biology to Drug Discovery. John Wiley & Sons, Inc.; USA: 2007; p: 119-40.

[9] Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H. Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2nd ed; CRC Press; USA: 2008; p: 71-101.

[10] Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 836-71.

[11] Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates of epidemic phage types. Belgian Study Group of Hospital Infections (GDEPIH/GOSPIZ). J Med Microbiol 1994; 41(4): 282-90.

[12] Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3115-21.

[13] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. 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.

[14] Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic Microbiology. 18th ed; Mosby Press; Philadelfia, USA: 1990; p: 323-32.

[15] Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S17. CLSI, 2007.

[16] Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of Staphylococcus aureus. Ann Intern Med 1982; 97(3): 339-44.

[17] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol 2001; 9(10): 486-93.

[18] Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. Curr Opin Chem Biol 2003; 7(5): 563-9.

[19] Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat 2003; 6(1): 41-52.

www.SID.ir

Archive of SID

[20] Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus: genetic basis. Microbiol Rev 1987; 51(1): 88-134.

[21] 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.

[22] Martins A, Cunha Mde L. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol 2007; 51(9): 787-95.

[23] Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of amino-glycosides in an era of emerging drug resistance. Int J Antimicrob Agents 1998; 10(2): 95-105.

[24] Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(11): 2977-86.

[25] Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycin-gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(6): 1534-5.

[26] Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Amino-glycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. Curr Microbiol 2008; 56(6): 558-62.

[27] Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. Curr Opin Microbiol 1999; 2(5): 499-503.

[28] Brown NM, Reeves DS. Mechanisms and epidemiology of aminoglycoside resistance. J Med Microbiol 1992; 36: 11-4.

[29] 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): 138-63.

[30] Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(11): 2164-8.

[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] Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4',4" adenyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from Staphylococcus aureus is encoded on an integrated copy of pUB110. Plasmid 1991; 25(1): 70-5.

[33] Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) and methicillin resistance among clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. Microbial Drug Resist 2009; 15(2): (ARTICLE IN PRESS).

[34] Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, Jabalameli F. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(3): 264-5.

www.SID.ir