Archive of SID

AUMJ Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، زمستان ۱۳۹۹، سال ۱۰، شماره ۱، صفحه‌های ۳۳-۴۲
مقاله تحقیقی

جداسازی سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین از بیماران بستری در بیمارستان‌های اصفهان و کاشان بر اساس ژن‌های *mecA* و *femA*

میترا امیدی[1]، فرزانه فیروزه[*2و3]، محمود صفاری[1]، حسین صداقت[1]

[1] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
[2] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
[3] مرکز تحقیقات گیاه درمانی و طب مکمل مبتنی بر شواهد، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۱/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: افزایش شیوع سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌های مقاوم یکی از معضلات مهم بهداشتی درمانی می‌باشد. در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیماران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و آخرین خط درمان بررسی و سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین براساس ژن‌های *mecA* و *femA* جدا سازی گردیده است.

مواد و روش ها: این پژوهش بر روی ۱٤٦ ایزوله *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده از بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزشی اصفهان و شهید بهشتی کاشان طی خرداد ماه ۱۳۹٦ تا شهریور ماه سال ۱۳۹۷ انجام پذیرفت. با توجه به پروتوکل‌های استاندارد CLSI چاپ شده در سال ۲۰۱۸، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج تعیین گردید، همچنین حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک ونکومایسین به روش براث میکرودایلوشن اندازه گیری شد. سویه‌های MRSA با روش فنوتیپی با استفاده از دیسک سفوکسیتین جداسازی گردید و جهت تایید تشخیص، ژن‌های *mecA* و *fem A* در سویه‌های فوق بررسی گردید.

یافته ها: از ۱٤٦ نمونه بالینی جمع آوری شده، فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین (۱٦/٤ ٪) ۲٤ و فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* حساس به متی‌سیلین (۸۳/٦ ٪) ۱۲۲ بدست آمد. بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۳۰/۱ ٪) ٤٤ بدست آمد و مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در هیچ یک از سویه‌ها مشاهده نگردید در حالیکه مقاومت به آنتی‌بیوتیک لینزولید به میزان (۳/۱ ٪) مشاهده گردید. در بررسی مولکولی به روش واکنش زنجیره پلی مراز (PCR)، تمامی *استافیلوکوکوس ارئوس*های مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن‌های *mecA* و *femA* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده وجود سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین با فراوانی نسبتاً بالا در نمونه‌های بالینی جدا شده از بیمارستان‌های اصفهان و کاشان می‌باشد. همچنین وجود مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و پر اهمیت به عنوان آخرین حربه درمانی، یک زنگ خطر جدی محسوب می‌گردد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *mec A* ، *fem A*

نویسنده مسئول:
دانشیارگروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۰۲۶۳۲۵۶۳۳۱۸
E-mail: firoozeh823@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استافیلوکوک ارئوس مهم‌ترین پاتوژن انسانی جنس *استافیلوکوکوس* است که به علت مقاومت روز افزون آنها در برابر انواع داروهای ضد میکروبی به صورت یک نگرانی جدی بهداشتی – درمانی مطرح می‌باشد.[۱] *استافیلوکوکوس ارئوس* دومین عامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های اجتماعی می‌باشد.[۱] محل اصلی کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس ارئوس* در انسان، بینی، پرینه و دست است. این باکتری باعث عفونت‌هایی از قبیل مسمومیت غذایی، عفونت پوستی، انتریت، استئومیلیت، فولیکولیت، آبسه، باکتریمی و سایر عفونت‌ها می‌گردد. از آنجایی که بروز عفونت‌ها و همچنین مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی اغلب با افزایش زمان بستری شدن، افزایش هزینه‌ها و در نهایت مرگ و میر بالای بیماران همراه است، یکی از نگرانی‌های مهم جامعه پزشکی است.[۲] مشکل عفونت‌های بیمارستانی ناشی از *استافیلوکوکوس ارئوس*، با افزایش شیوع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) که به تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و بسیاری دیگر از آنتی‌بیوتیک‌های موجود مقاوم هستند، بسیار پیچیده‌تر شده است.گزارشات نشان داده است که ۵۰-۲۵٪ انتقال باکتری فوق از طریق تماس مستقیم از جمله دست‌های آلوده یا انتقال از طریق قطرات آئروسل صورت می‌گیرد .کلونیزاسیون این باکتری در معتادان تزریقی، افراد وابسته به انسولین، بیماران مبتلا به بیماری پوستی، استفاده کنندگان از کاتترهای داخل عروقی در دراز مدت و کارکنان بیمارستان‌ها به وفور مشاهده می‌شود.[۳] متی‌سیلین در سال ۱۹۶۱ معرفی گردید و اولین پنی سیلین نیمه صنعتی بود که به پنی سیلیناز مقاوم می‌باشد، با این حال سویه‌های مقاوم به آن‌ها سریعا گزارش و نتیجه حاصله، بروز عفونت‌های مقاوم به متی‌سیلین، پدید آمدن و گسترش سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌باشد. اولین گزارش MRSA از یک بیمارستان بریتانیایی بود و بزودی کلون های MRSA سریعا به صورت جهانی گسترده گردید.[۴] عفونت‌های ناشی *از استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین در ابتدا فقط محدود به بیماران بستری در بیمارستان بود، اما پس از مدتی در جامعه نیز تشخیص داده شد و امروزه این سویه‌ها هم در جامعه و هم در بیمارستان جداسازی می‌گردند.[۵] این باکتری‌ها به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها , پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک، سفالوسپورین ها، کاربا‌پنم‌ها و مونوپنم‌ها مقاومت نشان می‌دهند.[۶] در یک مطالعه یک ساله از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ که توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌های عفونی اتحادیه اروپا در بیماران بستری بیمارستان‌ها انجام شد، در قبرس، ایتالیا، رومانی و پرتغال شیوع MRSA بیش از ۶۰٪ گزارش گردیده است.[۷] سیستم نظارت بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشور آلمان مطالعه ای در طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۰ انجام داده است، که شیوع MRSA را در بیماران سرپایی و بیمارستان‌ها به ترتیب ۱۰/۶ ٪ و ۱۹/۲٪ گزارش نموده است، البته *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین در بخش‌های جراحی عمومی و بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) به ترتیب ۳۴/۲٪ و ۲۷٪ گزارش گردیده است.[۸] در تهران در سال ۲۰۱۶ گودرزی و همکاران بر روی ۷۵ سویه *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده از نمونه بالینی بیماران بستری در ICU به مطالعه پرداختند و فراوانی *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین را ۹۳ ٪ بیان کردند.[۹] همچنین قنبری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ در اصفهان بر روی ۲۱۵ نمونه *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده از خون، زخم، ادرار و آبسه بیماران بستری در بیمارستان الزهرا به بررسی و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک پرداختند و فراوانی *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین را ۴۹/۹ ٪ گزارش کردند.[۱۰] مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های MRSA به علت کاهش تمایل بتالاکتام جهت اتصال به پروتئین‌های باند شونده به پنی سیلین (Penicillin-binding proteins) ایجاد می‌گردد. مقاومت به متی‌سیلین توسط ژن *mecA* رمز دهی می‌گردد که بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرکی بنام کاست کروموزومی استافیلوکوکی می‌باشد و پروتئین متصل شونده به پنی سیلین به نام PBP2a را رمزدهی می‌کند که دارای تمایل اتصالی پایین به سوبسترا است و در تمامی سویه های MRSAها یافت می‌شود.[۱۱و۱۲] ژن *mecA* باکتری را قادر می‌سازد تا سنتز دیواره سلولی را همچنان حفظ کند. Katayama و همکاران نشان داده‌اند که *mecA* بخشی از یک جزیره ژنومی *استافیلوکوک*‌ها به نام کاست کروموزومی mec (SCCmec) هستند که چندین نوع از این کاست کروموزومی شناسایی شده اند،

www.SID.ir

Archive of SID

که دارای وزن مولکولی مختلف از ۲۱ تا ٦۷ کیلو باز می‌باشند.[۱۳] علاوه بر ژن *mecA* , ژن *femA* در تمامی *استافیلوکوکوس ارئوس*های مقاوم به متی‌سیلین جهان وجود دارد. این ژن یک پروتئین ٤۸ کیلودالتونی را رمزدهی می‌کند که باعث تولید سمی می‌شود که در متابولیسم دیواره سلولی اختلال ایجاد می‌کند. مکانیسم عملکرد پروتئین فوق بدین صورت است که با اضافه کردن ۲و۳ گلایسین به پل‌های پنتا گلایسین باعث تغییر در پل‌های پنتا پپتیدی پنتاگلایسین که مشخصه پپتیدوگلیکان *استافیلوکوکوس ارئوس می‌*باشد، می‌گردد.[۱٤] از آنجا که سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین در بیمارستان‌ها و جامعه رو به گسترش می‌باشد، لذا داشتن اطلاعات کافی درباره الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های فوق و بررسی دقیق فراوانی سویه‌های فوق با استفاده از روش‌های مولکولی یک ضرورت می‌باشد. هدف از این پژوهش جداسازی سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهرهای اصفهان و کاشان بر اساس ژن‌های *mecA* و ژن *femA* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و تشخیص سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس*

مطالعه حاضر، یک مطالعه مقطعی – توصیفی می‌باشد. در این پژوهش از خرداد سال ۱۳۹٦ تا شهریور ۱۳۹۷، تعداد ۱٤٦ ایزوله *استافیلوکوک ارئوس* از نمونه‌های بالینی شامل: عفونت زخم سوختگی، عفونت چشم، خون، ادرار، عفونت‌های زخم ناشی از تصادف، عفونت زخم دیابتیک، عفونت‌های تنفسی و آبسه مغزی و از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آموزشی اصفهان (الزهرا، امین و سوانح سوختگی) و بیمارستان آموزشی شهید بهشتی کاشان جمع آوری شد. نمونه‌های بالینی در محیط‌های انتقالی از جمله محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) و محیط مغذی آبگوشت قلب- مغز (BHI) به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه کاشان انتقال داده شد و تست‌های اولیه شناسایی *استافیلوکوکوس ارئوس* براساس منابع معتبر بر روی آن‌ها انجام شد. ابتدا اسمیر تهیه شده و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد، سپس بر روی محیط‌های آگار خون دار (Blood) Agar و محیط اختصاصی مانیتول سالت آگار (Mannitol Salt Agar) کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. محیط‌های کشت فوق از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند. به منظور تشخیص افتراقی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* تست‌های کاتالاز، کواگولاز لوله‌ای و DNase انجام شد و سویه‌های تایید شده به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* وارد مطالعه و بررسی‌های بیشتر گردیدند.

تعیین الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی

برای تعیین الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) استفاده گردید. بدین منظور دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه شامل: اریترومایسین (۱۵gμ)، کلیندامایسین (۲μg)، سفازولین (۳۰μg)، سفوکسیتین (۳۰μg)، لینزولید (۳۰μg) وتری متو پریم سولفومتاکسازول (۲۵μg) از شرکتMAST انگلستان تهیه گردید. در این روش از کشت تازه باکتری، سوسپانسیونی با کدورت استاندارد نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه و سپس با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار فاقد نمک به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با در نظرگرفتن فاصله استاندارد بر روی محیط گذاشته شده و به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. هاله عدم رشد هر یک از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بعد از گذشت ۲٤ ساعت اندازه گیری شد. جهت سنجش میزان حساسیت به ونکومایسین از پودر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین تهیه شده از شرکت SIGMA آمریکا استفاده شد. حداقل غلظت مهاری (MIC) به روش براث میکرودایلوشن (Broth Microdilution) در میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای بر پایه روش رقیق سازی براساس پروتوکل استانداردهای CLSI در سال ۲۰۱۸ انجام شد. سپس میکروپلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد و میزان کدورت خانه‌ها بررسی و میزان حداقل غلظت مهاری تعیین گردید. از سویه *استافیلوکوک ارئوس* به شماره استاندارد ATCC 25923 به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص فنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین

تشخیص فنوتیپی سویه‌های MRSA با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین ۳۰ µg تهیه شده از شرکت MAST انگلستان، براساس استانداردهای CLSI و به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. در این روش از کشت تازه باکتری سوسپانسیونی با کدورت استاندارد نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه و سپس با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار فاقد نمک به صورت چمنی کشت داده شد و دیسک آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین با در نظرگرفتن فاصله استاندارد بر روی محیط گذاشته شد و به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. هاله عدم رشد بعد از گذشت ۲٤ ساعت اندازه گیری شد. هاله عدم رشد کمتر از ۲۱ میلی متر نشان دهنده مقاومت به سفوکسیتین و وجود سویه *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد. از *استافیلوکوک ارئوس* سویه COL (برگرفته از واژه Colindale) که سویه استاندارد *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد و از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید، به عنوان سویه کنترل استفاده گردید.

تشخیص مولکولی سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین براساس شناسایی ژن‌های *mecA* و *femA*

جهت تایید تشخیص سویه‌های MRSA به روش مولکولی، از بررسی ژن‌های *mecA* و ژن *femA* به روش واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) استفاده شد. بدین منظور، ابتدا باکتری‌های خالص در محیط آگار خون‌دار (Blood Agar) کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد. استخراج DNA به روش جوشاندن و نیز روش فنل-کلروفرم انجام شد. به منظور ردیابی ژن *mecA* از پرایمرهای اختصاصی شامل:

Forward: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3' و همچنین Revers: 5'-AACGTTGTAACCACCCCAAGA-3'، و نیز به منظور ردیابی ژن *femA* از پرایمرهای تخصصی طراحی شده شامل: Forward: 5'-CGATCCATATTTACCATATCA-3' و همچنین Revers: 5'-ATCACGCTCTTCGTTTAGTT-3' از شرکت (تکاپو زیست , تهران) استفاده شد.[14و15] واکنش زنجیره پلی مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مستر میکس (Master Mix Red , شرکت آمپلیکون شرکت دانمارک) با غلظت 1.5 mm Mgcl2 استفاده شد. مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس، ۱ میکرولیتر پرایمر رو به جلو، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده بود. واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل (Mastercycler® Gradient Eppendorf, Germany) انجام گرفت که برنامه دما و زمان لازم جهت تکثیر ژن *femA* شامل: واسرشت اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ٤۰ سیکل شامل واسرشت در ۹٤ درجه سانتی گراد،۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد، ٤۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد، ۵۰ ثانیه، و نهایتا طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه بوده و نیز برنامه فوق جهت تکثیر ژن *mecA* شامل: واسرشت اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۲دقیقه، ٤۰ سیکل شامل واسرشت در ۹٤ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه، اتصال در ۵۷ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه، و نهایتا طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه بود. از الکتروفورز برای جداسازی محصولات PCR ژن‌های مورد نظر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

فراوانی ژن‌های مورد نظر و نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و *استافیلوکوکوس ارئوس* حساس به متی‌سیلین (MSSA) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ آنالیز شده و مقادیر ($P<۰/۰۵$) معنا دار در نظر گرفته شده است. ارتباط بین سویه‌های MRSA و MSSA نیز با استفاده از آزمون کای اسکوئر (Chi-square) و آزمون دقیق فیشر (Fisher exact test) ارزیابی شد.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۱٤٦ ایزوله *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده

www.SID.ir

Archive of SID

از نمونه بالینی جمع آوری شده از بیمارستان‌های آموزشی اصفهان (سوانح سوختگی , امین و الزهرا) و بیمارستان آموزشی شهید بهشتی کاشان انجام شد. از این تعداد (۵۶/۲ ٪) ۸۲ نفر زن و (۴۳/۸٪) ٦٤ نفر مرد بودند. رنج سنی بیماران از ٤ ماه تا ۸٤ سال و میانگین سنی در این مطالعه ۴۳/۰۲ بوده است. نمونه‌های بالینی جمع آوری شده به ترتیب، بیمارستان سوانح سوختگی اصفهان (۳۸/٤ ٪) ٥٦، بیمارستان شهید بهشتی کاشان (۳۵/٦ ٪) ٥۲، بیمارستان الزهرا اصفهان (۲۱/۲ ٪) ۳۱ و بیمارستان امین اصفهان (٤/۸ ٪) ۷ می‌باشد . تعداد و نوع نمونه بالینی در جدول ۱ آمده است. نمونه‌های بالینی از بخش‌های مختلف بیمارستان به ترتیب بخش پوست (۳۸/٤ ٪) ٥٦، بخش اورژانس (۳٦/۹ ٪) ٥٤، بخش عفونی (۹/٦ ٪)١٤، بخش ICU (۹/۸ ٪) ۱۳ و نیز بیماران سرپایی (٦/۲ ٪) ۹ جدا شده است. در ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیشترین مقاومت در سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (۳۰/۱ ٪) ٤٤ نشان داده شد. همچنین سه ایزوله MRSA مقاوم به لینزولید شناسایی گردید. در جدول ۲ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ١٤٦ ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* نشان داده شده است. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* نشان داد، افرادی که دارای سن بالای ٦۰ سال بودند، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان دادند. در ارزیابی حداقل غلظت مهاری به آنتی بیوتیک ونکومایسین به روش میکرو براث دالوشن تمامی١٤٦ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به میزان MIC $\geq$ ۲ میلی لیتر/ میکروگرم نشان داده شد و در نتیجه تمامی نمونه‌ها به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند. فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین (١٦/٤ ٪) ٢٤ و سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* حساس به متی‌سیلین (۸۳/٦ ٪) ۱۲۲ بدست آمد. از ٢٤ ایزوله MRSA، تعداد (٤٥/۸ ٪) ۱۱ نفر بیمار زن و تعداد (٥٤/۲ ٪) ۱۳ نفر بیمار مرد بودند. همچنین ۲۰/٢٤ سویه MRSA دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) تشخیص داده شدند که (۳۷/٥ ٪) ۹ سویه مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه به چهار کلاس آنتی‌بیوتیکی را نشان دادند که شامل ۳ نمونه زخم سوختگی پوست و ٦ نمونه عفونت چشم بودند. همچنین (١٦/٦ ٪) ٤ سویه مقاومت آنتی بیوتیکی چند گانه به پنج کلاس آنتی‌بیوتیکی نشان دادند که شامل ۱ نمونه خون از بیمارستان شهید بهشتی کاشان و ۳ نمونه عفونت زخم سوختگی بودند. بیشترین جداسازی سویه‌های MRSA به ترتیب از نمونه‌های بالینی: عفونت زخم سوختگی (٦۲/٤ ٪) ۱٥ از بیمارستان سوانح-سوختگی اصفهان، عفونت چشم (۲٥٪) ٦ از بیمارستان‌های شهید بهشتی کاشان و امین اصفهان، عفونت خون (٤/۲ ٪) ۱ از بیمارستان شهید بهشتی کاشان، عفونت تنفسی (٤/۲ ٪) ۱ و آبسه مغزی (٤/۲ ٪) ۱ از بیمارستان الزهرا می‌باشد. بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون کای اسکوئر نشان داد، میان جداسازی سویه‌های MRSA، و خصوصیات دموگرافیک بیمار مانند سن (P =۰/۳۳) و جنس (P =۰/۰۸) ارتباط معنا داری وجود نداشت. همچنین در این سویه‌ها با استفاده از آزمون دقیق فیشر (Fisher exact test) ارتباط معنا داری (P <۰/۰۰۱) با مقاومت آنتی‌بیوتیکی با آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین، اریترومایسین، سفوکسیتین، سفازولین وتری متو پریم سولفومتاکسازول وجود داشت. همچنین ارتباط معنا داری میان سویه‌های MRSA و مقاومت چند گانه آنتی‌بیوتیکی مشاهده گردید (P < ۰/۰۰۱). ارزیابی نتایج الکتروفورز محصولات PCR حاصل تکثیر ژن‌های مقاوم به متی‌سیلین، نشان داد، ٢٤ سویه MRSA بدست آمده با روش‌های تشخیص فنوتیپی، دارای محصولات ژنی با طول‌های ٢٨٦ و ٤٥۰ جفت باز که به ترتیب نشان دهنده حضور ژن‌های *mecA* و *femA* در آنها می‌باشد، بودند (شکل‌های۱ و ۲).

جدول ۱: فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیمارستان‌های اصفهان و کاشان بر حسب نوع نمونه بالینی

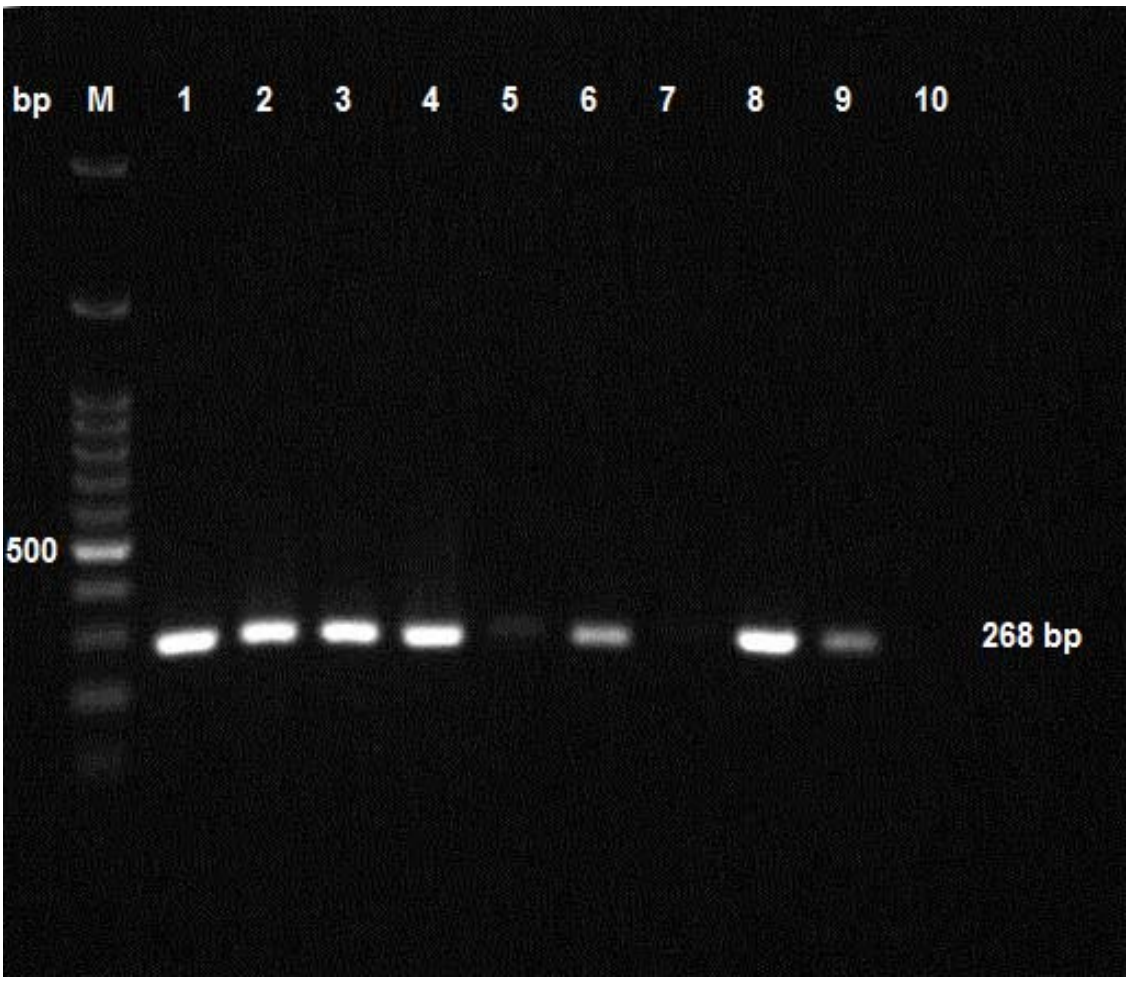
نام نمونه	تعداد (٪)
عفونت زخم پوست سوختگی	٥٦ (۳۸/٤ ٪)
عفونت چشم	٤۹ (۳۳/٥ ٪)
خون	۳ (۳/۱ ٪)
ادرار	۹ (٦/۲ ٪)
زخم دیابتیک	٥ (۳/٤ ٪)
زخم تصادف	٦ (٤/۱ ٪)
عفونت تنفسی	۱۱ (۷/٥ ٪)
آبسه مغزی	٥ (۳/٤ ٪)
سایر عفونت‌ها	۲ (۱/٤ ٪)
جمع کل	١٤٦ (۱۰۰٪)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان‌های اصفهان و کاشان

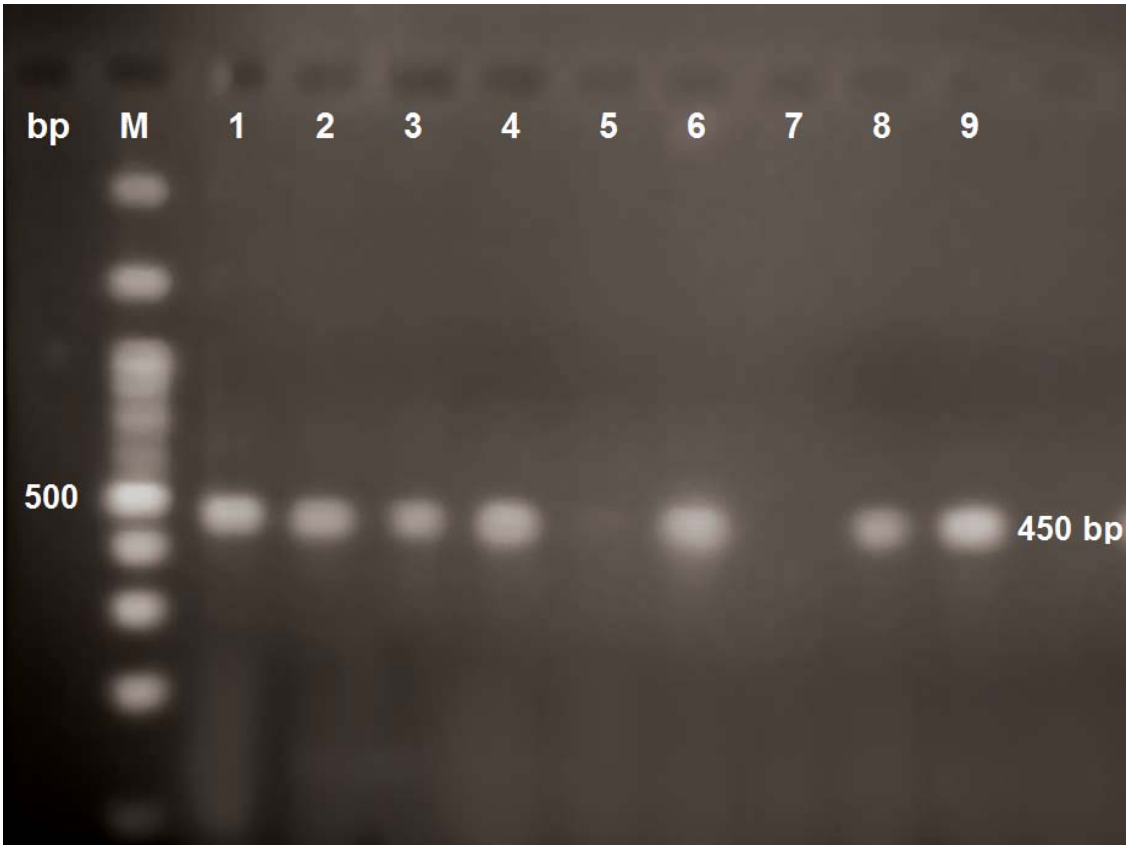
آنتی‌بیوتیک	حساس	حد واسط	مقاوم
	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
اریترومایسین	٦٨ (٪ ٤٦/٦)	٣٤ (٪ ٢٣/٣)	٤٤ (٪ ٣٠/١)
کلیندامایسین	١٠٦ (٪ ٧٢/٦)	١٨ (٪ ١٢/٣)	٢٢ (٪ ١٥/١)
سفوکسیتین	١٢٢ (٪ ٨٣/٥)	–	٢٤ (٪ ١٦/٤)
سفازولین	١٣٠ (٪ ٨٩)	٢ (٪ ١/٣)	١٤ (٪ ٩/٥)
لینزولید	١٤٣ (٪ ٩٧/٩)	–	٣ (٪ ٢/١)
تری متو پریم سولفومتاکسازول	١٢٨ (٪ ٨٧/٧)	٤ (٪ ٢/٧)	١٤ (٪ ٩/٦)



شکل ۱: الکتروفورز محصولات واکنش PCR ژن *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان‌های اصفهان و کاشان. ستون M: DNA سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: نمونه کنترل مثبت ژن *mecA*، ستون‌های ٤-٢، ٦، ٨ و ٩ سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حامل ژن *mecA*، ستون‌های ۵، ۷ و ۱۰: کنترل منفی شامل مخلوط PCR بدون DNA الگو.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲: الکتروفورز محصولات واکنش PCR ژن *femA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیماران بیمارستان‌های اصفهان و کاشان. ستون M: DNA سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: نمونه کنترل مثبت ژن *femA* ، ستون‌های ٤-۲، ٦، ۸ و۹ سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین و حامل ژن *femA* ، ستون‌های ۵ و۷: کنترل منفی شامل مخلوط PCR بدون DNA الگو.

بحث و نتیجه‌گیری

سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت بیمارستانی در جهان می‌باشد. از آن جا که در عصر حاضر بروز و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک روند رو به افزایش دارد، شناسایی دقیق سویه‌های دارای مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی به ویژه در مورد باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مانند *استافیلوکوک ارئوس* در مدیریت درمان بیماران دچار عفونت با باکتری‌های فوق الذکر اهمیت بسزایی دارد. در سال‌های اخیر بررسی ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین به ویژه ژن *mecA* به عنوان استاندارد طلایی جهت شناسایی سویه‌های MRSA معرفی شده است. همچنین استفاده از دیسک سفوکسیتین به جای دیسک اگزاسیلین به عنوان حساس‌ترین متد جهت شناسایی مقاومت مرتبط با ژن *mecA* در سویه‌های MRSA می‌باشد.[۱۶] در مطالعه حاضر فراوانی سویه‌های MRSA در میان ایزوله‌های *استافیلوکوک ارئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های کاشان و اصفهان با هردو روش فنوتیپی و مولکولی (١٦/٤ ٪) بدست آمد. شیوع MRSA در مطالعات مختلف بسیار متفاوت گزارش شده است. براساس گزارشات موجود شیوع MRSA در شرق و جنوب آسیا بین ۲/۳ تا ٦٩/١ درصد متغیر است. [۱۷] در مطالعه اوحدی مقدم و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تهران بر روی ۱۳۵ نمونه عفونت زخم و عفونت بافت نرم در بیمارستان‌های تهران، شیوع *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش دیسک دیفیوژن و استفاده از دیسک اگزاسیلین و نیز با بررسی ژن *mecA* (٦٨/١ ٪) ٤٥ گزارش شده است.[۱۸] همچنین در مطالعه انجام شده توسط ژاپنی و همکاران در شیراز بر روی ۳٥٦ ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های بالینی بیماران شیوع سویه‌های MRSA ۴۳/۸۸ ٪ می‌باشد.[۱۹] شیوع سویه‌های MRSA در مطالعات فوق در مقایسه با مطالعه حاضر بالاتر می‌باشد اما قابل مقایسه با مطالعه انجام شده در شهرهای مازندران، مرکزی و اصفهان بوده و بدلیل اینکه از نمونه‌های بالینی با اهمیت مانند عفونت زخم سوختگی جدا سازی شده است و احتمال گسترش آن در میان این بیماران وجود دارد بسیار با اهمیت می‌باشد.[۲۰] مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* همچنین نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و کلیندامایسین ایجاد شده است. بررسی سایر مطالعات مرتبط نیز نشان دهنده وجود بالاترین میزان مقاومت در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند اریترومایسین می‌باشد.[۱۸و۲۱] همچنین نتایج مطالعه ما از لحاظ اینکه اکثریت سویه های MRSA جدا شده دارای فنوتیپ MDR بوده و دارای مقاومت همزمان به چندین آنتی‌بیوتیک می‌باشند، همسو با نتایج سایر مطالعات در این زمینه می‌باشد.[۱۸و ۲۱] آنتی‌بیوتیک لینزولید یک کلاس آنتی‌بیوتیکی جدید می‌باشد که جهت درمان عفونت‌های ناشی از MRSA اخیرا معرفی گردیده است و به عنوان آخرین حربه درمانی در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های MRSA بسیار با اهمیت می‌باشد. گزارش مبنی بر مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به لینزولید بسیار محدود و نادر می‌باشد.[۲۲] در مطالعه حاضر ۲/۱ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* دارای مقاومت به لینزولید بودند. در اکثر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف ایران و کشورهای همجوار، تمامی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی دارای حساسیت به آنتی‌بیوتیک لینزولید گزارش شده اند.[۱۸و۱۹و۲۳] اگر چه در مطالعه آریانپور و همکاران در مشهد فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به لینزولید ۵/۴۷٪ بدست آمد.[۲۳] مقاومت به آنتی‌بیوتیک لینزولید در مطالعه حاضر برای اولین بار در منطقه بوده به ویژه به دلیل اینکه از نمونه‌های بالینی مانند زخم سوختگی جدا سازی شده است از نظر گسترش در بیمارستان در بخش‌هایی مانند بخش سوختگی که بیمارانش تحت درمان طولانی مدت آنتی‌بیوتیکی قرار دارند یک زنگ خطر بسیار جدی محسوب می‌گردد. به دلیل گسترش رو به افزایش سویه‌های MRSA، آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی از جمله ونکومایسین درمان انتخابی عفونت‌های پیشرفته و تهاجمی ناشی از سویه‌های MRSA را تشکیل می‌دهند، اگر چه بروز سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* با مقاومت بینابینی به ونکومایسین Vancomycin- Intermediate *S. aureus* (VISA) و نیز با مقاومت کامل به ونکومایسین Vancomycin-Resistant *S. aureus* (VRSA)امروزه به صورت یک مشکل اساسی در درمان عفونت‌های شدید ناشی از سویه‌های فوق مطرح می‌باشد.[۲۴] در مطالعه حاضر همسو با مطالعات دیگر در این زمینه هیچ یک از سویه‌های MRSA و MSSA جدا شده از نمونه‌های بالینی دارای مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین نبوده و دارای MIC ≤ 2 میلی لیتر/ میکروگرم بودند.[۹و۱۹] در برخی مطالعات مانند مطالعه انجام شده در شهر مشهد و نیز در ارومیه فراوانی‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به ونکوماسین به ترتیب ۵/۰۴٪ و ۵/۰۸ ٪ گزارش شده است.[۲۳و۲۴] عدم جداسازی سویه‌های *استافیلوکوک ارئوس* مقاوم به ونکومایسین از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های منطقه ما نشان دهنده این است که هنوز این آنتی‌بیوتیک پر ارزش می‌تواند در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های MRSA موثر باشد، البته مطالعات گسترده‌تر با استفاده از روش‌های مولکولی و بررسی ژن‌های مقاومت به ونکومایسین مانند ژن *van* می‌تواند تایید کننده ادعای فوق باشد. نهایتاً نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده وجود سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین با فراوانی نسبتاً بالا در نمونه‌های بالینی جدا شده از بیمارستان‌های اصفهان و کاشان می‌باشد. همچنین وجود مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جدید و پر اهمیت به عنوان آخرین حربه درمانی، یک زنگ خطر جدی محسوب می‌گردد.

References

1. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. Int J Antimicrob Agents 2012; 39(4):273-82.
2. Baker TM, Satlin MJ. The growing threat of multidrug-resistant Gram-negative infections in patients with hematologic malignancies. Leuk Lymphoma 2016; 57(10):2245-2258.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Mirzaii M, Emaneini M, Jabalameli F, et al. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus* isolated from the patients, personnel, air and environment of an ICU in a hospital in Tehran. J Infect Public Health 2015; 8(2):202-206.
4. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005;40(4):562-573.
5. Onwubiko NE, Sadiq NM. Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria. Pan African Med J 2011; 8 (1):1-7.
6. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg Infect Dis 2001;7(2):178-182.
7. Gould IM, David MZ, Esposito S, et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. Int J Antimicrob Agents 2012;39(2):96-104.
8. Köck, R, Mellmann A, Schaumburg F, et al. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. Dtsch Arztebl Int 2011; 108(45): 761-767.
9. Goudarzi M, Goudarzi H, Sá Figueiredo AM, et al. Molecular Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Intensive Care Units in Iran: ST22-SCCmec IV/t790 Emerges as the Major Clone. PLoS One 2016;11(5):e0155529.
10. Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R, et al. Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. Adv Biomed Res 2016;5:62.
11. de Lencastre H, Sá Figueiredo AM, Urban C, et al. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35(4):632-639.
12. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother 1989;33(11):1869-1874.
13. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol. 2005;43(10):5026-5033.
14. Chikkala R, George N, Kamaraju S, et al. Heterogeneity in *femA* in the Indian isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. Advances in Infectious Diseases 2012; 2(3):82-88.
15. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2008;14(3):217-220.
16. Afrough P, Pourmand MR, Sarajian AA, et al. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus*, *coa* and *spa* genes in Ahvaz hospitals, staff nose compared with patients clinical samples. Jundishapur J Microbiol 2013;6(4):e5377.
17. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. Crit Care 2017;21(1):211.
18. Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Mahmoudi M, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: characterization of major clones and emergence of epidemic clones of sequence type (ST) 36 and ST 121 in Tehran, Iran. FEMS Microbiol Lett 2015;362(8):fnv043.
19. Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, et al. Characterization of SCCmec types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Iran. Jpn J Infect Dis 2011;64(1):28-33.
20. Dadashi M, Nasiri MJ, Fallah F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist 2018;12:96-103.
21. Yıldız Ö, Çoban AY, Şener AG, et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 Hospitals in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2014;13:44.
22. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, et al. The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus. J Antimicrob Chemother 2013;68(1):4-11.
23. Arianpoor A, Estaji F, Naderinasab M, et al. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolates against newly marketed antibiotics: a report from Imam Reza Hospital of Mashhad, Iran. Razavi Int J Med 2015; 3(4): e31568.
24. Ghahremani M, Jazani NH, Sharifi Y. Emergence of vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus* among methicillin-resistant *S. aureus* isolated from clinical specimens in the northwest of Iran. J Glob Antimicrob Resist 2018;14:4-9.

www.SID.ir

Archive of SID

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, January 2021, Vol. 10, No. 1: 33-42 *Original Article*

Mitra Omidi[1], Farzaneh Firoozeh[2,3*], Mahmood Saffari[1], Hossein Sedaghat[1]

[1] Department of Microbiology, School of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
[2] Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[3] Evidence-based Phytotherapy and Complementary Medicine Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* according to *mecA* and *femA* Genes Among Hospitalized Patients in Kashan and Isfahan Hospitals

Received: 7 Apr. 2019; Accepted:11 May 2020

Abstract

Background and Aim: Increased prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and treatment of infections due to these resistant strains is one of the most important health challenges. In this study, antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates from patients were determined to commonly prescribed and last-resort antibiotics, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains were isolated according to detection of *mecA* and *femA* genes.

Materials and Methods: This research was done on 146 *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized and outpatients who referred to Isfahan Hospitals and Shahid-Beheshti Hospital of Kashan from June 2017 to September 2018. Antimicrobial resistance patterns to common antibiotics were determined by disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018 guidelines. Also Vancomycin minimum inhibitory concentration (MIC) of MRSA strains was determined using broth microdilution method. Isolation of MRSA strains were phenotypically done using cefoxitin disk and for confirmation *mecA* and *femA* genes were detected in these strains.

Results: From 146 collected clinical samples, frequencies of MRSA and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) were 24 (16.4%) and 122 (83.6%) respectively. The most resistance rate were detected to erythromycin 44 (30.1%) and vancomycin resistance was not seen among the *S. aureus* isolates, whereas linezolid resistance was 2/1 percent. In molecular study using PCR method, all MRSA strains carried *mecA* and *femA* genes.

Conclusion: Current study showed that the frequency of MRSA among clinical samples isolated from Isfahan and Kashan Hospitals is relatively high. Also the presence of resistance to new and important antibiotics as last resort treatment is considered a serious alarm.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, *mecA*, *femA*

***Corresponding Author:**
Associate Professor of Bacteriology, Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj 3149779453, Iran

Tel: 02632563318
E-mail: firoozeh823@gmail.com

www.SID.ir