

بررسی مقاومت دارویی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومايسين در برخی از بیمارستان های شهر رشت

الهام امیری^۱، معصومه انوری^۲

^۱ کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه

^۲ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است و نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان می دهد. هدف از این مطالعه، بررسی فنوتیپی و مولکولی ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين جدا شده از بیمارستان های شهر رشت در یک دوره شش ماهه (بهمن ۹۴ تا تیر ۹۵) بود.

روش بررسی: ۲۱۷ نمونه بالینی از بخش های مختلف بیمارستان های شهر رشت جمع آوری شدند. ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس با تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. جهت تعیین مقاومت میکروبی سویه ها به آنتی بیوتیک ونکومايسين از آزمون های فنوتیپی دیسک دیفیوژن (طبق دستورالعمل CLSI) و حداقل غلظت مهار کنندگی به روش ماکرودایلوشن برآستفاده شد. همچنین حضور ژن *VanA*، کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومايسين در ایزوله های جدا شده، به روش *PCR* مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها: ۶۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند. در تست تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن، میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل ۱۰/۵ درصد، جنتامایسین ۲۵/۳۷ درصد، تتراسایکلین ۳۷/۳۲ درصد، ونکومايسين ۳۸/۸۰ درصد، اگزاسیلین ۴۴/۷۰ درصد، پنی سیلین ۱۰۰ درصد بود. در روش ماکرودایلوشن برآستفاده شد، ۲۲/۴ درصد نمونه ها مقاومت به ونکومايسين را نشان دادند. در روش *PCR*، برای ژن *VanA* باندی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: توصیه می شود در مطالعات مولکولی، حضور ژن های *VanA* و *VanB* هر دو بررسی شود، چرا که علت مقاومت می تواند مربوط به حضور ژن *VanB* باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ونکومايسين، مقاومت آنتی بیوتیکی، *VanA*.

مقدمه

سپتی سمی، اندوکاردیت، پنومونی و آبسه های عمیق پوستی است (۴-۲). این باکتری از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است و نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، ماکرولیدها و مقاومت نشان می دهد. همچنین این باکتری از نظر ایجاد عفونت های بیمارستانی پس از سودوموناس آئروژینوزا در مرتبه دوم قرار دارد. کانون های عفونت ناشی از این باکتری به طور عمده زخم، ترشحات دستگاه تنفسی و پوست هستند (۵). از دیگر دلایل اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس می توان به مقاومت نسبت به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها به دلیل استفاده بیش از حد

از دهه ۸۰ میلادی تاکنون میکروارگانیسم های گرم مثبت به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عامل اصلی عفونت های بیمارستانی معرفی شده اند (۱). استافیلوکوکوس اورئوس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها، مانند عفونت های خفیف پوستی و بیماری های سیستمیک تهدید کننده حیات مانند

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، الهام

امیری (email: Elham.amiri56@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۲/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۴/۲۰

مواد و روشها

در این مطالعه، تعداد ۲۱۷ نمونه در یک دوره شش ماهه (بهمن ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵) از نمونه‌های مختلف بالینی (زخم، خون، ادرار، ترشحات تناسلی و ترشحات تنفسی) از مراکز درمانی و بیمارستان‌های شهر رشت جمع آوری شد. مواد و وسایل لازم شامل دیسک‌های آنتی بیوتیک، محیط کشت، گلیسرول، آمپول ونکومايسين ۵۰۰ میلی گرمی، الكل ۷۰ درصد، کیت رنگ آمیزی گرم، روغن ایمرسیون، پرایمر، مسترمیکس ($dNTPs=0/5\mu L$ ، $MgCl_2=1/5\mu L$ ، آنزیم Taq پلیمرز = $0/5\mu L$ ، بافر $1\times TBE$ = $2/5\mu L$ ، DNA الگو، لدر، پاور لود و پودر آگارز، انکوباتور، پنس استریل، سوآپ استریل، پیپت و پوآر، میکروسکوپ نوری، فریزر با دمای $-70^\circ C$ درجه سانتی‌گراد، لوله آزمایش، جا لوله‌ای، دستگاه الکتروفورز، دستگاه میکروسانتریفوژ ترموسایکلر و سمپلر بودند.

جداسازی میکروارگانيسم

نمونه‌های دریافت شده از بیماران ابتدا روی محیط بلاد آگار و نوترینت آگار کشت داده شدند. گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل تست کاتالاز، کوآگولازو تخمیر مانیتول روی محیط مانیتول سالت آگار (Manitol Salt agar) تعیین هویت شدند.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

پس از جداسازی نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)، با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی ونکومايسين ($30\mu g$)، پنی‌سیلین ($10\mu g$)، تتراسیکلین ($30\mu g$)، کلرامفنیکل ($30\mu g$)، جنتامایسین ($10\mu g$) و اگزاسیلین ($1\mu g$) تعیین شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی از شرکت پادتن طب خریداری شدند. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن ثبت شد. برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) به روش میکرودایلوشن براث از پودر آنتی بیوتیک ونکومايسين ۵۰۰ میلی گرمی متعلق به شرکت داروسازی دلتا بر اساس استاندارد CLSI استفاده شد. ابتدا رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره آنتی بیوتیکی جهت انجام MIC، روزانه تهیه شد. غلظت آنتی بیوتیک جهت MIC از یک

آنتی بیوتیک‌ها، توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت اشاره کرد (۶).

مکانيسم‌های متفاوتی جهت ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد. این باکتری با تولید بتالاکتاماز نسبت به بسیاری از پنی سیلین‌ها مقاوم می‌شود. همچنین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام (نفسیلین، متی سیلین و اگزاسیلین) نیز به وسیله تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین ایجاد می‌شود (۷). مقاومت پلاسمیدی نسبت به تتراسیکلین‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها و آنتی بیوتیک‌های دیگر نیز در این باکتری شایع است. با افزایش مقاومت نسبت به متی سیلین، از ونکومايسين جهت درمان این باکتری‌ها استفاده شد (۸،۹).

ونکومايسين گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند. اطلاعات ژنتیکی مقاومت به ونکومايسين در اپرون *VanA* قرار دارد. این عامل سیستمی از ژن‌های قابل انتقال از طریق پلاسمید است (۱۰). مهم‌ترین ژن‌های مقاومت در استافیلوکوکوس‌ها شامل *VanA*، *VanB*، *VanC1* و *VanC2/C3* هستند. ژن‌های *VanA* و *VanB* به عنوان مهم‌ترین ژن‌های مسئول مقاومت به ترتیب بر روی ترانسپوزون‌های Tn1546 و Tn1547 قرار دارند که می‌توانند بر روی کروموزوم یا پلاسمید یافت شوند. ژن‌های *VanC1* و *VanC2/C3* کروموزومی هستند (۱۱-۱۳). اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين در سال ۲۰۰۲ از بیماری در کشور آمریکا جدا شد. بررسی‌ها نشان داده‌اند این سویه هم دارای ژن مقاومت نسبت به ونکومايسين (*Van*) و نیز ژن مقاومت نسبت به متی سیلین (*mecA*) است (۱۴).

مصرف بیش از حد و خودسرانه آنتی بیوتیک در درمان و همچنین وقوع جهش و انتقال ژن‌های مقاومت از جمله دلایل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف محسوب می‌شود. با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و پتانسیل این ارگانيسم در ایجاد عفونت‌های شدید، لزوم انجام تحقیقات وسیع و جامع بر روی استافیلوکوکوس اورئوس کاملاً احساس می‌شود. مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين جدا شده از سطح بیمارستان‌های شهر رشت در یک دوره شش ماهه (بهمن ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵) انجام گرفت.

جدول ۱. مشخصات پرایمر Van A

نام پرایمر	توالی پرایمری	طول محصول PCR
VanA Forward	5'-ATGAATAGAATAAAAAGTTGC-3'	1032bp
VanA Reverse	3'-TCACCCCTTTAACGCTAATA-5'	

بیوتیک، جنسیت، سن و نوع نمونه) توسط آزمون HSD (اختلاف معنی دار حقیقی) صورت گرفت. سپس تحلیل نتایج با استفاده از آزمون آماره فیشر (تجزیه واریانس یک طرفه) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها

از میان نمونه‌های جمع آوری شده، ۶۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند. از این ۶۷ مورد، ۸ جدایه از بیماران مرد و ۵۹ جدایه از بیماران زن بودند. از این تعداد، ۱۷ نمونه زخم، ۳ نمونه ترشحات تنفسی، ۲ نمونه خون، ۴۴ نمونه ادرار و ۱ نمونه ترشحات تناسلی بودند. حداقل و حداکثر سن در نمونه‌های بالینی ۱ تا ۸۵ سال بود. پس از تعیین هویت نسبت به تحلیل نتایج اقدام شد. توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب نمونه در جدول ۲ نمایش داده شده است که نشان می‌دهد بیشترین ایزوله‌ها مربوط به نمونه ادرار بودند.

نتایج حاصل از تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد باکتری‌های جدا شده بیشترین مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۱۰۰٪) و کمترین مقاومت را نسبت به کلرامفنیکل (۱۰/۴٪) داشتند. از مجموع ۶۷ نمونه بالینی، در دیسک دیفیوژن ۳۸/۸۰ درصد مقاوم و ۶۱/۲۰ درصد حساس به ونکومايسين بودند. در تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن بر روی ۶۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت ایزوله‌ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک مختلف براساس جدول CLSI به ترتیب زیر بود: پنی سیلین ۱۰۰ درصد، اگزاسیلین ۴۴/۷ درصد، ونکومايسين ۲۵/۳۷ درصد، تتراسایکلین ۳۷/۳۲ درصد، جنتامایسین ۳۷/۳۲ درصد و کلرامفنیکل ۱۰/۵ درصد (جدول ۳). در روش MIC، ۲۲/۴ درصد مقاوم، ۹ درصد نیمه حساس و ۶۸/۷ درصد حساس به ونکومايسين بودند. دامنه MIC ونکومايسين سویه‌های آزمایش شده بین یک میکروگرم بر میلی لیتر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

میکروگرم بر میلی لیتر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. تعیین MIC بر اساس جدول CLSI صورت پذیرفت. به این منظور، جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت برات در غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس اولین لوله از راست به چپ که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC ثبت شد. در این مطالعه، از سویه استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد PTCC1189 به عنوان شاهد استفاده شد.

بررسی مولکولی مقاومت به ونکومايسين

در ابتدا جدایه‌ها در محیط نوترینت برات کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شد. در این تحقیق از یک جفت پرایمر VanA جهت شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومايسين استفاده شد.

جهت تأیید استخراج DNA، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ μl با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۱۰۰ μM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرهای مورد استفاده که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است، توسط شرکت BIONEER صورت گرفت (۱۵). واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر ۴۸ Labcycler (SensoQuest GmbH، آلمان) طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه توسط افزار SPSS تحلیل شد. مقایسه سطوح مختلف عوامل متغیر مورد بررسی (آنتی

جدول ۲. توزیع فراوانی مطلق ونسبی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد نمونه	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
ادرار	۴۴	۳۲/۵۰	۹/۸	۵۷/۷۰
خون	۲	۴۶/۷	۶/۶	۴۶/۷
زخم	۱۷	۵۷	۱۳/۲	۲۹/۸
مجرای تناسلی	۱	۸۳/۳	۱۶/۷	-
مجرای تنفسی	۳	۵۷	۱۱/۱	۲۹/۸

جدول ۳. نتایج آنتی‌بیوگرام مربوط به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده به روش دیسک دیفیوژن (تفسیر نتایج براساس جدول CLSI)

آنتی بیوتیک	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
ونکومايسين	۳۸/۸۰	-	۶۱/۲۰
اگزاسيلين	۴۴/۷	۱/۶	۵۳/۷
جنتاميسين	۲۵/۳۷	۱۰/۵	۶۴/۱۸
تتراسايكلين	۳۷/۳۲	۲۳/۸۸	۳۸/۸۰
پنی سیلین	۱۰۰	-	-
کلرامفنیکل	۱۰/۵	۲۸/۳۵	۶۱/۲۰

جدول ۴. نتایج MIC مربوط به ونکومايسين (تفسیر نتایج براساس جدول CLSI)

تعداد نمونه ها	مقدار کدورت	حساس	نیمه حساس	مقاوم	درصد
۱۵	≥ 16	-	-	+	۲۲/۴
۶	۴-۸	-	+	-	۹
۴۶	≤ 2	+	-	-	۶۸/۷

بیشترین MIC ونکومايسين به دست آمده برابر با یک میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد (جدول ۴).

در این مطالعه، بررسی حضور ژن مقاومت *VanA* با استفاده از پرایمر اختصاصی بر روی تمامی ایزوله های جدا شده انجام گرفت. نتایج تست PCR نشان داد که هیچ یک از نمونه‌ها دارای ژن *VanA* نبودند.

بحث

امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها، افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده می‌شود. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا به عنوان چالش مهمی برای جامعه پزشکی در درمان بیماری‌های عفونی مطرح شده است. استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت و از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی بیوتیک‌ها است. در سال‌های اخیر وقوع جهش‌های مختلف و دریافت ژن‌های مقاومت از سایر میکروارگانیسم‌ها به خصوص انتروکوک‌ها باعث افزایش

مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های بالینی شده است. ونکومايسين، آنتی بیوتیک گلیکوپپتیدی است که به طور گسترده‌ای در درمان بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه مقاومت به داروهای مختلف از جمله ونکومايسين در جهان رو به افزایش است و شاهد مقاومت چند دارویی در انواع مختلف پاتوژن‌ها هستیم (۱۶). در این تحقیق، میزان وابستگی (رابطه) جنسیت، سن و نوع نمونه با عفونت محاسبه شد. در بررسی انجام شده بین جنسیت با میزان عفونت و سن با عفونت در برابر آنتی بیوتیک‌های استفاده شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$)، اما بین نوع نمونه با عفونت اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). در بررسی مهاجری و همکارانش، اختلاف معنی‌داری در این مورد وجود نداشت ($P > 0.05$). سن و جنسیت مستقل از عفونت است (۱۷) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

در این تحقیق، از نظر میزان مقاومت میکروبی، پنی سیلین بالاترین میزان مقاومت میکروبی (۱۰۰ درصد) و کلرامفنیکل پایین‌ترین میزان مقاومت میکروبی (۱۰/۴ درصد) را داشت

($P < 0.05$). نتایج مطالعه کارماهاپاترا و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان داد که ۲۶/۶۷ درصد سویه ها مقاوم به جنتامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل و ونکومایسین بودند که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (۱۸). در مطالعه صفدری و همکارانش (سال ۱۳۹۰) میزان مقاومت به پنی سیلین ۹۷ درصد و مقاومت به اگزاسیلین ۶۳ درصد گزارش شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با هم داشتند (۱۹)؛ این نتایج با نتایج مطالعه حاضر در مقاومت به پنی سیلین هم خوانی دارد.

در مطالعه حاضر، میزان مقاومت به ونکومایسین به روش ماکرودایلویشن براث (MIC) ۲۲/۴ درصد گزارش شد. علت این امر می تواند مربوط به مصرف بیش از اندازه آنتی بیوتیک در این مناطق و انتشار کلون های تحت فشار مصرف آنتی بیوتیکی باشد. در مطالعه احمدی شعار و همکارانش (سال ۱۳۸۵) در تبریز هیچ مورد مقاوم و یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین گزارش نشد. دامنه MIC سویه های آزمایش شده به ونکومایسین را بین ۱/۵-۳ μg/ml گزارش کرده اند (۲۰). نتایج فوق با مطالعه حاضر مشابهت ندارد. در این مطالعه، ۹ درصد سویه ها مقاومت حد واسط به ونکومایسین نشان دادند. در مطالعه ای که توسط نیکولتی و همکارانش (سال ۲۰۰۶) انجام شد، تنها ۷ درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت حد واسط به ونکومایسین داشتند (۲۱). نتایج فوق با نتایج حاصل از پژوهش ما هم خوانی دارد.

در این تحقیق، ۶۸/۷ درصد سویه ها به روش MIC حساس بودند. در مطالعه تاتی و همکارانش (سال ۲۰۱۱) در حیدرآباد از مجموع ۳۵۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۱۶ سویه (۴/۵ درصد) MIC در حدود ۸-۴ میکروگرم در میلی لیتر را نشان دادند که به عنوان VISA گزارش شدند (۲۲). به طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام جدایه های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، موثرترین آنتی بیوتیک ها در این تحقیق کلرامفنیکل (۱۰/۴ درصد)، جنتامایسین (۲۵/۳۷ درصد)، تتراسایکلین (۳۲/۳۷ درصد) و ونکومایسین (۳۸/۸۰ درصد) بودند. همچنین بیشترین مقاومت باکتری جدا شده از نمونه های بالینی به ترتیب در برابر آنتی-بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰ درصد) به دلیل تولید آنزیم بتالاکتاماز و بعد اگزاسیلین (۴۴/۷ درصد) بود. همچنین در این تحقیق، به روش PCR چون با یک پرایمر *Vana* انجام شد، هیچ یک از نمونه های مقاوم به ونکومایسین دارای باند مربوط به ژن *Vana* نبودند. احتمالاً مقاومت به ونکومایسین

مربوط به ژن های دیگر مانند *VanB* است. در مطالعه فرهادیان و همکارانش (۱۳۸۶-۱۳۸۷) از هفت شهر ایران، PCR با پرایمرهای خاص برای شناسایی ژن های *VanA*، *VanB* و *MecA* به کار برده شد. هیچ یک از سویه ها دارای باند مربوط به *Vana* نبودند (۲۳) که با مطالعه ما مشابهت دارد.

مطالعات نشان داده اند که عدم موفقیت در درمان با ونکومایسین باعث بوجود آمدن سویه های *hvisa* می شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات مشابه، مشاهده می شود که فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت است. لذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق باشد. همچنین می تواند مرتبط با میزان مصرف آنتی بیوتیک در این مناطق، بروز مکانیسم های مختلف مقاومت و انتشار کلون های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی بیوتیکی باشد. همچنین این مسئله می تواند مربوط به پیدایش موتاسیون در ژن مقاومت به ونکومایسین در بین این سویه ها با وجود تفاوت های فیزیولوژیکی مانند تغییر در دیواره باکتری باشد. تحقیقات نشان می دهند دلایل تفاوت های موجود در نتایج بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی بسیار متنوع هستند. روش های فنوتیپی تحت تاثیر عوامل محیطی هستند و برخی از استافیلوکوکوس ها فاقد ژن مقاومت به ونکومایسین هستند، ولی به دلیل ترشح زیاد بتالاکتاماز در محیط کشت به صورت کاذب به عنوان سویه های مقاوم شناسایی می شوند. شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین گاهی اوقات به دلیل بیان ناهمگن مقاومت پیچیده است و تاثیرپذیر از متغیرهایی مانند دما pH و غلظت نمک است (۲۴). در میان سویه هایی که با روش فنوتیپی مقاوم به ونکومایسین هستند، روش مولکولی هیچ کدام از سویه ها حاوی ژن *Vana* نبودند. این تفاوت ها ناشی از توزیع متفاوت این ژن در مکان های گوناگون، روش های بیان آنها و یا به دلیل وجود ژن های دیگر است. حضور ژن مقاومت در میکروارگانیسم نشان دهنده فنوتیپ مقاومت نیست. درحقیقت بیان ژن مقاومت تحت کنترل شرایط مختلف محیطی و احتمالاً ژن های دیگری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی، حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروب شناسی است. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به خاطر همکاری، نهایت تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Silva EC, Antas Md, Monteiro B Neto A, Rabelo MA, Melo FL, Maciel MA. Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* in health care workers at a university hospital of Recife-PE. *Braz J Infect Dis* 2008;12:504-8.
2. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E. Patients with Panton- Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalization. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012;3:48-55.
3. Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol* 2011;49:111-7.
4. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:505-20.
5. Woo P, Lau SK, Wong SS, Yuen KY. *Staphylococcus aureus* subcutaneous abscess complicating acupuncture need for implementation of proper infection control guidelines. *New Microbiol* 2003;26:169-74.
6. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:629-41.
7. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis* 2005;40:178- 91.
8. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of Vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;93:195-8.
9. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005;40:562-73.
10. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res* 2008;127:78-84.
11. Méndez-Álvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. *Int Microbiol* 2010;3:71-80.
12. Muneeri SS, Mobaiyen H, Mirzaie H. Study on Vancomycin-resistant staphylococcus aureus and identification of VanA gene in these strains isolated from Tabriz Shuhada Hospital using e-test and PCR methods. *Life Sci J* 2013;10:748-52.
13. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:615-21.
14. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342-7.
15. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. The VanA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol Gen Genet* 1990;224:364-72.
16. Moza B, Varma AK, Buonpane RA, Zhu P, Herfst CA, Nicholson MJ, et al. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. *EMBO J* 2007;26:1187-97.
17. Mohajeri P, Izadi B, Rezaei M, Falahi B, Moradi Z, Zare ME. Study of nasal carriage Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients in Kermanshah. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2012;15:485-92.
18. Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and Characterization of a vancomycin resistant staphylococcus aureus isolated from Kolkata (South Asia). *J Med Microbiol* 2008;57:79-2.
19. Safdari H, Sadeghian A. Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, the most common antibiotics Ghaem Hospital in Mashhad in year 1390. *1390;1:43-6*.
20. Ahmadishoar SH, Nahaei MR, Amirmozafari N. Sensitivity of strains isolated from clinical specimens against vancomycin using E-test in tabriz. *TUOMS* 2008;30:17-23.
21. Nicoletti G, Schito G, Fadda G, Boros S, Nicolosi D, Marchese A, et al. Bactrial isolates from sever infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of Nation wide study in the hospital setting. *J Chemother* 2006;18:589-602.

22. Thati V, Shivannavar CT, Gaddad SM. Vancomycin resistance tertiary care hospitals in Hyderabad. Indian J Med Res 2011;134:704-8.
23. Farhadian A, Behzadian Nejad Q, Najari Peerayeh SH, Rahbar M, Vaziri F. Etermination of vancomycin and methicillin Resistance in clinical Isolates of staphylococcus aureus in Iranian Hospitals. Br Microbiol Res J 2008;4:454-61.
24. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the mecA gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:600-4.