مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۴
صفحه: ۱۸۳۷-۱۸۲۶

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.1, Mar-Apr 2015
Pages: 1826-1837

بررسی فراوانی مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس به روش‌های فنوتیپی و مولکولی در شهر یزد

علی اکبر یوسفی[۱]، گیلدا اسلامی [۲]، هنگامه زندی [*۳]، محمود وکیلی [۴]

چکیده

مقدمه: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عامل طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی می‌باشد. برای درمان آنتی‌بیوتیکی و کنترل عفونت لازم است که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین به سرعت و دقت شناسایی شوند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های بالینی این باکتری به روش‌های فنوتیپی و مولکولی بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی تعداد ۱۱۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی بیمارستان شهید صدوقی یزد جدا و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک تعیین و حداقل غلظت مهارکنندگی اگزاسیلین (MIC) به روش E. test انجام شد. همچنین تعیین ژن mecA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR انجام شد.

نتایج: از میان ایزوله‌های مورد بررسی، در روش دیسک دیفیوژن ۳۷/۷ درصد به اگزاسیلین و ۴۲/۱ درصد به سفوکسیتین مقاومت نشان دادند. نتایج MIC نشان داد که ۴۷ نمونه (۴۱/۲٪) مقاوم به اگزاسیلین بودند. در حالی که ۵۴ نمونه (۴۷/۴ درصد) به روش PCR دارای ژن mec A بودند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت، در آمپی‌سیلین (۹۹/۱ درصد)، پنی‌سیلین (۹۸/۲ درصد)، تتراسیکلین (۵۵/۳ درصد)، اریترومایسین (۳۷/۷ درصد)، کلیندامایسین (۳۲/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین (۳۲/۵ درصد)، افلوکساسین (۳۱/۶ درصد) و جنتامایسین (۲۶/۳ درصد) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مقاومت چند دارویی در بین ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس رایج است. همچنین جهت تعیین مقاومت به متی‌سیلین استفاده از دیسک سفوکسیتین مفیدتر از اگزاسیلین می‌باشد. با این وجود ژن mec A در برخی نمونه‌هایی که به روش دیسک دیفیوژن حساس بودند، نیز مشاهده گردید. تکنیک PCR بهترین روش برای شناسایی سریع سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت دارویی، دیسک دیفیوژن

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۲- استادیار گروه انگل شناسی ، مرکز تحقیقات تشخیص مولکولی مخاطرات مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۳- استادیار گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات تشخیص مولکولی مخاطرات مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
۴- استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۰۸۸۳۲۴، پست الکترونیکی: hengameh_zandi @yahoo.com
- این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می باشد.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری کوکسی شکل و گرم مثبت می‌باشد و اغلب بر روی پوست و غشاهای مخاطی حضور دارد. این باکتری یک عامل بیماری‌زای بسیار قوی در ایجاد بیماری‌های اکتسابی از بیمارستان و عفونت‌های اکتسابی از جامعه محسوب می‌شود(۱،۲).

سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA: Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus) تهدیدی جدی در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند و روند درمان این عفونت‌ها را با مشکل مواجه می‌سازند(۳). تاریخچه مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به سال ۱۹۴۱ میلادی برمی‌گردد، هنگامی که پنی‌سیلین برای درمان عفونت‌ها به کار رفت و دو سال بعد از تجویز این دارو، اولین سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین گزارش شد که به دلیل تولید نوعی پنی‌سیلیناز بود. برای حل این مشکل محققان آنتی‌بیوتیکی نیمه صناعی به نام متی‌سیلین که نسبت به پنی‌سیلیناز مقاوم بود را عرضه کردند، ولی یک سال بعد در سال ۱۹۶۱ میلادی مقاومت به این دارو در انگلستان گزارش شد. اکنون این سویه‌ها در تمام دنیا پخش شده‌اند(۲). فراوانی سویه‌های MRSA در کشورهای آسیایی نظیر چین، کره و تایوان بیش از ۷۰ درصد، در آمریکای شمالی بیش از ۵۰ درصد، در اروپا ۲۰ درصد و در ایران حدود ۵۰ درصد گزارش شده است(۷-۴).

مقاومت نسبت به متی‌سیلین در سویه‌های MRSA از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام (PBP2a: Penicillin Binding Protein 2a) می‌باشد که تمایل اتصال بسیار ضعیفی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد(۸،۹). PBP2a توسط ژن mecA کد می‌شود و با کاست کروموزومی بزرگ ژنی (SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome mec) منتقل و در کروموزوم سویه‌های مقاوم قرار دارد(۱۰). سویه‌هایی که دارای این ژن هستند به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر از جمله تتراسیکلین، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها هم مقاومت نشان می‌دهند (مقاومت چندداروییی) که علاوه بر ایجاد مشکلات در درمان بیماری، سبب کلونیزاسیون و انتشار در محیط بیمارستان و سایر بیماران می‌گردند(۱۱). به طوری که عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها از ۲ درصد در سال ۱۹۷۵ میلادی به ۳۴ درصد در سال ۱۹۹۲ میلادی و به ۶۴ درصد در سال ۲۰۰۳ میلادی افزایش یافت(۱۲). به طور مثال در تحقیقی در اصفهان شیوع سویه‌های MRSA، ۴۱/۳ درصد بود و در تحقیقی دیگر در اراک ۸۰ درصد ایزوله‌ها دارای ژن mecA بودند(۱۲،۱۳). بر اساس مطالعات انجام شده، بیماران دارای عفونت MRSA، نسبت به آنهایی که با (MSSA: Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus) عفونی می‌شوند، مدت طولانی تری در بیمارستان بستری می‌شوند، بنابراین علاوه بر هزینه درمان بیشتر، پیشرفت عفونت به باکتریمی و یا اندوکاردیت و همچنین مرگ و میر بیشتر اتفاق می‌افتد، لذا تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و درمان به موقع این باکتری جهت جلوگیری از انتشار سویه‌های MRSA از اهمیت به سزایی برخوردار است(۱۶-۱۴).

هدف از این پژوهش، بررسی فراوانی سویه‌های MRSA با روش انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) به روش E- test و تعیین ژن mecA در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی در شهر یزد می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی به روش مقطعی، با توجه به مطالعات مشابه، فراوانی ژن mecA در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۴۰ درصد گزارش شده که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای ۹ درصد، تعداد نمونه‌های لازم ۱۱۴ مورد برآورد شد که به روش نمونه‌گیری آسان از خرداد ۹۲ تا اردیبهشت ۹۳ از نمونه‌های مختلف بالینی (مانند خون، ترشح ریه، ادرار، زخم و ...) از بیمارستان شهید صدوقی جدا و پس از کشت نمونه بیمار در محیط آگار خوندار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

(شرکت Liofilchem- ایتالیا) و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، پرگنه‌های طلایی و یا سفید رنگی که در رنگ‌آمیزی گرم به صورت کوکسی گرم مثبت خوشه‌ای شکل مشاهده شدند به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی منتقل شده و به وسیله آزمایشات متداول بیوشیمایی مانند کاتالاز، تولید کواگولاز توسط پلاسمای سیتراته خرگوش به روش لوله‌ای، همچنین کشت در محیط‌های مانتیول- سالت آگار (Liofilchem- ایتالیا) و DNase (Liofilchem- ایتالیا) تعیین هویت شدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (Kirby-bauer) و بر اساس استاندارد CLSI 2013(clinical and laboratory standards institute)(۱۷)، بر روی محیط مولر هینتون آگار فاقد نمک انجام شد. بدین صورت که از پرگنه‌های باکتری رشد کرده بر روی محیط آگار خوندار (به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله نیم مک فارلند استفاده و به وسیله سوآپ استریل بر روی محیط مولرهینتون آگار (Liofilchem- ایتالیا) کشت چمنی داده شدند.

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده (Liofilchem- ایتالیا) شامل: اگزاسیلین ۱µg، سفوکسیتین ۳۰µg، ونکومایسین ۳۰µg، لینزولید ۳۰µg، پنی‌سیلین ۱۰IU، تری‌متوپریم-سولفومتوکسازول(SXT) ۲۵µg، کلیندامایسین ۲µg، سیپروفلوکساسین ۵µg، تتراسیکلین ۳۰µg، جنتامایسین ۱۰µg، افلوکساسین ۵µg، اریترومایسین ۱۵µg، آمپی‌سیلین ۱۰µg بودند که به فاصله ۲۴ میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک به وسیله خط کش اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت گردید.

از سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و ATCC43300 (MRSA) (داروا‌ش- ایران) به عنوان کنترل در این آزمایش تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

از روش E- test جهت تعیین MIC اگزاسیلین استفاده گردید. در این روش از نوارهای E test (Liofilchem- ایتالیا) استفاده شد که در یک سمت آن عامل آنتی‌بیوتیکی با گرادیان غلظتی وجود دارد و در سمت دیگر آن نمودار عدد مربوط به غلظت نوشته می‌شود. در این روش همانند روش دیسک دیفیوژن، از کشت تازه (۲۴ ساعته) باکتری سوسپانسیون معادل غلظت لوله نیم مک فارلند تهیه گردید و بر روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح گردید. سپس نوارهای E test روی آگار قرار داده شد و به مدت ۱۸ -۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، عدد مربوط به محل تلاقی اکلیپس ایجاد شده با نوار به عنوان MIC در نظر گرفته شد. اگر MIC برابر با ۲ یا کمتر از آن باشد، سویه حساس و اگر برابر ۴ یا بیشتر باشد، مقاوم در نظر گرفته شد(۱۳).

برای استخراج ژنوم باکتری از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. ابتدا از یک پرگنه (حداکثر) کشت شبانه داده و سپس از کشت شبانه استخراج انجام شد. بدین صورت که از سوسپانسیون باکتری به مقدار یک میلی‌لیتر داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در g×۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی را خالی کرده و روی رسوب یک میلی‌لیتر محلول نمک فسفات با خصیت بافری (PBS: Phosphates Buffered Saline) (بافر شستشو) استریل ریخته، سوسپانسیون یک نواختی تهیه گردید و به مدت ۳ دقیقه در g×۵۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد. این مراحل تا سه بار انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت ۱۵دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و در g×۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی که حاوی DNA باکتری بود برای PCR مورد استفاده قرار گرفت(۱۸).

جهت ردیابی ژن mecA از تکنیک duplex-PCR استفاده شد. جهت انجام آن از پرایمرهای مشخص شده در جدول ۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

استفاده شد(۱۹). از ژن femA (آنزیم کوآگولاز را در استافیلوکوکوس اورئوس کد می‌کند و برای بیان ژن mecA ضروری است) برای اطمینان از مثبت بودن استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد.

پس از چند بار آزمایش شرایط بهینه برای انجام PCR به دست آمد. واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل بافر با غلظت نهایی 1X، dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار، MgCl2 با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، پرایمر با غلظت نهایی ۴ پیکومول از هریک و ژنوم انگل با غلظت ۱۰۰ نانوگرم استفاده شد. قابل ذکر است که جهت دستیابی به حجم ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر دو بار تقطیر استریل استفاده شد.

به منظور تکثیر هر یک از ژن‌های femA و mecA به روش PCR، برنامه دمایی شامل واسرشتگی اولیه (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه با برنامه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد. در نهایت این برنامه با مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA ATCC33591) به عنوان کنترل مثبت برای ژن mecA استفاده شد.

محصول PCR نمونه‌ها به همراه کنترل‌های مثبت و منفی با استفاده از روش ژل آگارز الکتروفورز و در کنار DNA Ladder 100bp (Solis Bio Dyne- استونی) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های femA و mecA

Gene	Primer Name	5′ ⟶ 3′	Product size
femA	femA-F	CGATCCATATTTACCATATCA	450 bp
	femA-R	ATCACGCTCTTCGTTTAGTT	
mecA	mecA-F	ACGAGTAGATGCTCAATATAA	293 bp
	mecA-R	CTTAGTTCTTTAGCGATTGC	

داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل گردید. برای توصیف داده‌ها از جدول و نمودار استفاده شد و برای تحلیل داده‌ها از آزمون کای اسکوئر و آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه از ۱۱۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد ۷۳(۶۴٪) نمونه مربوط به مردان و۴۱(۳۶٪) نمونه مربوط به زنان بود. از نظر سنی بیماران حداقل دارای سن یک ماه و حداکثر دارای سن ۹۰سال با میانگین سنی ۴۴/۶۹ بودند. از این تعداد ۷۵ (۶۵/۸٪) نمونه از بیماران بستری و ۳۹ (۳۴/۲٪) نمونه از بیماران سرپایی جدا شده بود. از ۱۱۴ ایزوله مورد بررسی، تعداد ۵۴ (۴۷/۴٪) ایزوله از زخم، ۲۳ (۲۰/۲٪) ایزوله از تراشه و مجاری تنفسی، ۱۸ (۱۵/۸٪) ایزوله از خون، ۱۲ (۱۰/۵٪) ایزوله از ادرار و ۷ (۶/۱٪) ایزوله از سایر نقاط بدن جدا شد.

با توجه به جدول ۲ بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۹۹/۱٪) و پنی‌سیلین (۹۸/۲٪) بود. تمامی نمونه‌ها به لینزولید کاملاً حساس بوده و نیز هیچگونه مقاومتی به ونکومایسین مشاهده نشد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

جدول ۲: سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه با روش دیسک دیفیوژن

آنتی‌بیوتیک مورد بررسی	حساس تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)
پنی سیلین (P)	۲ (۱/۸)	------	۱۱۲ (۹۸/۲)
آمپی سیلین (AM)	۱ (۰/۹)	------	۱۱۳ (۹۹/۱)
تتراسیکلین (TE)	۵۰ (۴۳/۹)	۱ (۰/۹)	۶۳ (۵۵/۳)
جنتامایسین (GM)	۸۴ (۷۳/۷)	------	۳۰ (۲۶/۳)
سیپروفلوکساسین (CP)	۷۲ (۶۳/۲)	۵ (۴/۴)	۳۷ (۳۲/۵)
افلوکساسین (OFX)	۷۳ (۶۴)	۵ (۴/۴)	۳۶ (۳۱/۶)
کوتریموکسازول (SXT)	۱۰۸ (۹۴/۷)	۱ (۰/۹)	۵ (۴/۴)
کلیندامایسین (CC)	۷۶ (۶۶/۷)	۱ (۰/۹)	۳۷ (۳۲/۷)
اریترومایسین (E)	۵۸ (۵۰/۹)	۱۳ (۱۱/۴)	۴۳ (۳۷/۷)
لینزولید (LNZ)	۱۱۴ (۱۰۰)	------	-------
ونکومایسین (V)	۱۰۴ (۹۱/۲)	۱۰ (۸/۸)	-------
اگزاسیلین (OX)	۶۱ (۵۳/۵)	۱۰ (۸/۸)	۴۳ (۳۷/۷)
سفوکسیتین (FOX)	۶۶ (۵۷/۹)	-----	۴۸ (۴۲/۱)

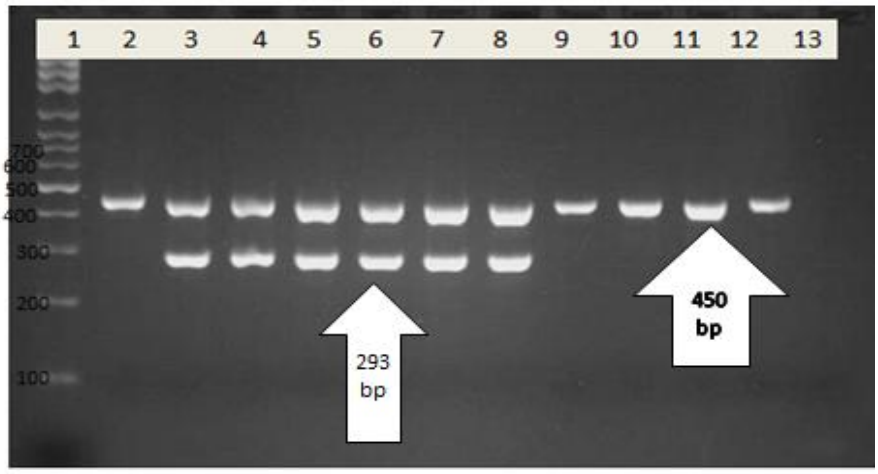
۴۸ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سفوکسیتین جهت تعیین MIC مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که جدول ۳ نشان داده شده، ۴۷ ایزوله دارای MIC ≥2 µg/ml بودند که در بین آنها ۲۷ (۵۶/۱٪) ایزوله دارای MIC≥256 µg/ml بود. همچنین یک ایزوله نیز نسبت اگزاسیلین حساس بود (MIC≤2 µg/ml).

جدول ۳: MIC اگزاسیلین برای استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

میزان MIC	≥۲	۴	۶	۸	۱۲	۱۶	۲۴	۳۲	۴۸	۹۶	>۲۵۶	جمع کل
تعداد	۱	۱	۲	۴	۱	۳	۱	۵	۱	۲	۲۷	۴۸
درصد	۲/۰۸	۲/۰۸	۴/۱۶	۸/۳۲	۲/۰۸	۶/۲۴	۲/۰۸	۱۰/۴	۲/۰۸	۴/۱۶	۵۶/۱۶	۱۰۰

در این مطالعه کلیه ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس توسط ژن fem A مورد تأیید قرار گرفتند. مقاومت به متی‌سیلین با پرایمر اختصاصی ژن mecA بررسی شد. شکل ۱ بررسی تکثیر با استفاده از آزمایش ژل آگارز الکتروفورز شده برای محصول PCR را نشان می‌دهد. قطعه ژن تکثیر را نشان می‌دهد. قطعه ۲۹۳ جفت بازی مربوط به ژن mecA و قطعه ۴۵۰ جفت بازی مربوط به ژن femA می‌باشد. از ۱۱۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ۵۴ (۴۷/۴٪) ایزوله دارای ژن mecA بودند. فراوانی ژن mecA در نمونه‌های زخم و تراشه بیشتر از سایر نمونه‌ها بود. فراوانی ژن mecA در انواع نمونه های جدا شده در جدول ۴ لحاظ شده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]



شکل ۱: نتایج حاصل از تکثیر ژن‌های me A و femA توسط آزمایش ژل آگارز الکتروفورز.

ستون ۱: مارکر ۱۰۰جفت بازی، ستون ۲: کنترل مثبت برای ژن femA، ستون ۳: کنترل مثبت برای ژن mecA وfem A، ستون‌های ۸-۴: نمونه‌های بالینی مثبت برای ژن‌های mec A و fem A، ستون‌های ۱۲-۹: نمونه‌های بالینی دارای ژن fem A، ستون ۱۳: کنترل منفی

جدول ۴: فراوانی ژن mecA در نمونه‌های ایزوله شده

ژن mec A نوع نمونه	مثبت تعداد (درصد)	منفی تعداد (درصد)	جمع تعداد (درصد)	P-Value
زخم	۲۲ (۴۰/۷)	۳۲ (۵۹/۳)	۵۴ (۱۰۰)	
تراکئال	۱۹ (۸۲/۶)	۴ (۱۷/۴)	۲۳ (۱۰۰)	
خون	۶ (۳۳/۳)	۱۲ (۶۶/۷)	۱۸ (۱۰۰)	
ادرار	۴ (۳۳/۳)	۸ (۶۶/۷)	۱۲ (۱۰۰)	۰/۰۰۵
سایر نمونه‌ها	۳ (۴۲/۹)	۴ (۵۷/۱)	۷ (۱۰۰)	
جمع	۵۴ (۴۷/۴)	۶۰ (۵۲/۶)	۱۱۴ (۱۰۰)	

بحث

شناسایی و درمان سریع عفونت‌های ناشی از MRSA از اقدامات مهم در پیشگیری از گسترش عفونت و کاهش خطر مرگ و میر بیماران است. سویه‌های MRSA علاوه بر اینکه نسبت به متی‌سیلین و داروهای بتالاکتام مقاوم هستند، مقاومت بیشتری نیز نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند(۱۷،۲۰).

در مطالعه حاضر، ۱۱۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس به روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های MRSA مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد، ۵۴ (۴۷/۴٪) ایزوله از زخم، ۲۳ (۲۰/۲٪) ایزوله از تراشه و مجاری تنفسی، ۱۸ (۱۵/۸٪) نمونه ایزوله از خون، ۱۲ (۱۰/۵٪) ایزوله از ادرار و ۷ (۶/۱٪) از سایر نقاط بدن جدا شد.

تحقیقات در آمریکا، کانادا و اروپا نشان می‌دهد که استافیلوکوکوس اورئوس ۲۲ درصد عفونت‌های خونی، ۲۳/۲

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

درصد عفونت‌های تنفسی و ۳۹/۲ درصد عفونت‌های پوستی را باعث می‌شود. در تحقیق حاضر میزان شیوع عفونت‌های پوستی ۴۷/۴ درصد، عفونت مجاری تنفسی ۲۰/۲ درصد، عفونت خون ۱۵/۸ درصد بود(۱).

در مقایسه روش‌های مختلف جهت تعیین استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، از روش انتشار دیسک و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین و سفوکسیتین استفاده شد که ۴۸ (۴۲/۱٪) نمونه از ایزوله‌ها مقاوم به سفوکسیتین و۴۳ (۳۷/۷٪) نمونه نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند. ژن mecA در ۵۴ (۴۷/۴٪) نمونه از این ایزوله‌ها مشاهده شد. از ۵۴ ایزوله mecA مثبت، ۴۷ (۸۷٪) ایزوله‌ها در روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند و ۷ (۱۳٪) ایزوله به طور منفی کاذب حساس به متی‌سیلین بودند. این نتیجه نشان می‌دهد که روش انتشار دیسک جهت شناسایی ژن mecA می تواند نتایج منفی کاذب ایجاد نماید. در مطالعه‌ای که توسط Merlino در استرالیا بر روی ۲۰۶ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، ۶۸ درصد از ایزوله‌ها به طور فنوتیپی حساسیت به اگزاسیلین را نشان دادند، در این میان ۱ ایزوله با فنوتیپ حساس، دارای ژن mecA بود و از ۳۲ درصد باقی مانده که به طور فنوتیپی مقاوم بودند، ۴ مورد فاقد ژن mecA بودند(۱۱).

در بررسی Petinaki و همکاران در یونان، ۲۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نظر مقاومت به متی‌سیلین با روش‌های دیسک دیفیوژن و PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۷ ایزوله (۱۴/۸ درصد) از نظر ژن mecA مثبت و ۲۱۳ ایزوله (۸۵/۲ درصد) منفی بود. از ۳۷ ایزوله mecA مثبت، ۳۰ ایزوله (۸۲ درصد) در روش دیسک دیفیوژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند و ۷ ایزوله (۱۸ درصد) به طور منفی کاذب حساس به متی‌سیلین بودند(۲۱). در مطالعه Havaei و همکاران در اصفهان، از ۶۲ ایزوله mecA مثبت، ۵۲ (۸۵/۴٪) ایزوله در روش دیسک دیفیوژن مقاومت به متی‌سیلین را نشان دادند و ۹ (۱۴/۵٪) نیز به طور منفی کاذب حساس به متی‌سیلین بودند(۱۲).

در مقایسه استفاده از دیسک‌های اگزاسیلین و سفوکسیتین جهت تعیین MRSA، پنج ایزوله که در روش دیسک دیفیوژن نسبت به اگزاسیلین حساسیت نشان دادنده بودند، نسبت به سفوکسیتین مقاومت داشتند و ژن mecA در آنها شناسایی شد و در روش E-test نیز در گروه استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین قرار گرفتند. بنابراین استفاده از دیسک سفوکسیتین در تعیین استافیلوکوکوس اورئوس بسیار دقیق‌تر و ارزشمندتر از دیسک اگزاسیلین است. در پژوهشی که توسط Anand در هند انجام شد، به منظور شناسایی سویه‌های MRSA، استفاده از سنجش حساسیت به سفوکسیتین را دقیق‌تر از استفاده از سنجش حساسیت به اگزاسیلین ذکر کرده‌اند(۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Rezaei و همکاران در اراک انجام شده، روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین را با حساسیت و ویژگی بالا به ترتیب ۹۶/۲٪ و ۹۸/۸٪ برای شناسایی مقاومت به متی‌سیلین گزارش کرده‌اند(۲۳). در مقالات دیگر نیز روش انتشار دیسک با دیسک‌های سفوکسیتین و موکسالاکتام را به عنوان روش‌های جایگزین برای انتشار دیسک معرفی کرده‌اند(۲۰،۲۲). در مطالعه حاضر نیز جهت تعیین استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین نسبت به دیسک دیفیوژن اگزاسیلین از حساسیت بیشتری برخوردار بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تعیین MIC اگزاسیلین به روش E-test، در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن، روش دقیق‌تری جهت شناسایی MRSA می‌باشد و با روش‌های مولکولی تعیین mecA همخوانی بالایی دارد. چنانچه یک نمونه که به روش انتشار دیسک نسبت به اگزاسیلین وسفوکسیتین مقاومت داشته ولی در روش E-test، MIC آن کمتر از ۲µg/ml بود که نشان از حساسیت به اگزاسیلین دارد و نیز در روش PCR هم ژن mecA در این نمونه شناسایی نشد. همچنین ۲۷ (۵۶/۱٪) سویه‌های MRSA دارای MIC≥256 µg/ml (مقاومت سطح بالا به اگزاسیلین) بودند. در مطالعه انجام شده توسط Ercis در ترکیه نیز به حساسیت و اختصاصیت بالای روش E-test اشاره شده و این روش به عنوان روش دقیقی که در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

آزمایشگاه‌های بالینی قابل استفاده است، اشاره شده است(۲۴). در صورتی که در مطالعه Felten و همکاران در فرانسه روش E.test قادر به شناسایی همه گونه‌های MRSA نبود(۲۰). در مطالعه‌ای که در ژاپن صورت گرفت ۲۹٪ از ایزوله‌های MRSA دارای MIC بیشتر یا مساوی ۵۱۲µg/ml بودند(۲۵). که نتایج مطالعه حاضر با نتایج این مطالعات همخوانی دارد. درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های MRSA با MIC بالا نیازمند تجویز دوز بالای آنتی‌بیوتیک در مبتلایان به این عفونت ها می‌باشد که می‌تواند علاوه بر گسترش میزان مقاومت باعث ایجاد عوارض جانبی نیز گردد.

در مطالعه حاضر از میان ۱۱۴ نمونه، ۵۴ (۴۷/۴٪) مورد دارای ژن mecA و مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و ۶۰(۵۲/۶٪) مورد به متی‌سیلین حساس (MSSA) بودند که از این تعداد، ژن mecA در ۸۲/۶٪ نمونه‌های تنفسی و ۴۰/۷٪ نمونه‌های زخم مشاهده گردید که بین نوع نمونه و شیوع ژن mecA ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید. در مطالعه Ahmadi و همکارش در کرمانشاه، ژن mecA در ۵۸٪ ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد که از این تعداد ۸۹٪ ایزوله‌ها از زخم بودند(۲۶) که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. در مطالعه Kiani Nia بیشترین میزان حضور ژن mecA در نمونه‌های لوله تراشه و بینی گزارش گردید و نمونه زخم کمترین فراوانی را از نظر ژن mecA داشت(۲۷). در مطالعه Akpaka در هند بیشترین موارد شناسایی سویه‌های MRSA از نمونه‌های زخم و مربوط به بخش جراحی بود(۲۸). در مطالعه Najar Perayeh و همکاران در تهران، از ۱۷۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های مختلف بالینی شامل خون، خلط، زخم و تراشه، ۸۴ مورد (۴۸/۲٪) دارای ژن mecA بودند و فراوانی این ژن در نمونه‌های تراشه بیشتر از سایر نمونه‌ها بود(۲۹) که با مطالعه حاضر همخوانی داشت. در مطالعه Gaznavi Rad و همکاران در اراک ژن mecA در ۸۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد که از این تعداد بیشترین نمونه‌ها مربوط به خون (۳۶/۲٪)، ریه (۲۲/۵٪) و زخم (۲۵٪) بود(۱۳). مقاومت به متی‌سیلین در اروپا ۲۰٪ ولی در آمریکا بین ۲۳ تا ۵۵ درصد گزارش شده است(۳۰،۳۱). در ایران، فراوانی سویه‌های MRSA در تحقیق Rahbar و همکاران ۵۳ درصد و در گزارش Fatholazadeh و همکاران ۳۶ درصد بوده است(۱۷،۳۲). درصد بالای عفونت MRSA در نمونه‌های مورد مطالعه حاضر بدین دلیل است که این نمونه‌ها اکثرا از بیماران بستری در بیمارستان بوده است. البته نتایج مطالعه حاضر با نتایجی که در سال‌های اخیر در ایران دیده شده، همخوانی دارد. افزایش رو به رشد در روند پخش ژن mecA در میان سویه‌های جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی نیازمند اقدامات مهم پزشکی در جهت پیشگیری از پخش MRSAها است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، جهت شناسایی مقاومت به متی‌سیلین روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین ارزش بیشتری نسبت به روش دیسک دیفیوژن اگزاسیلین دارد. همچنین تکنیک PCR بهترین روش برای شناسایی سریع سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین می‌باشد و چون بعضی از سویه‌ها در آزمایش‌های فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین به دلیل عدم بیان ژن mecA حساس می‌باشند، توسط PCR مورد شناسایی قرار می‌گیرند.

سپاسگزاری

از همکاری کارشناسان بخش میکروب شناسی بیمارستان شهید صدوقی یزد و آزمایشگاه مرکزی یزد تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References:

1- Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. ***Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against S. aureus infection: from the lab bench to phase III clinical trials.*** Vaccine 2004; 22(7): 880-7.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

2- Wielders CL, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. ***mecA gene is widely disseminated in Staphylococcus aureus population.*** J Clin Microbiol 2002; 40(11): 3970-5.

3- Stewart GT, Holt RJ. ***Evolutio of natural resistance to the newer penicillins.*** Br Med J 1963; 1(5326): 308-11.

4- Aires de Sousa M, Crisostomo MI, Sanches IS, Wu JS, Fuzhong J, Tomasz A, et al. ***Frequent recovery of a single clonal type of multidrug-resistant Staphylococcus aureus from patients in two hospitals in Taiwan and China.*** J Clin Microbiol 2003; 41(1): 159-63.

5- Barber M. ***Methicillin-resistant staphylococci.*** J Clin Pathol 1961; 14: 385-93.

6- Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. ***Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe, 1999-2002.*** Emerg Infect Dis 2004; 10(9): 1627-34.

7- Wang JT, Chen YC, Yang TL, Chang SC. ***Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan.*** Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42(3): 199-203.

8- Hartman BJ, Tomasz A. ***Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus.*** J Bacteriol 1984; 158(2): 513-6.

9- Sabath LD, Wallace SJ. ***The problems of drug-resistant pathogenic bacteria. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci.*** Ann N Y Acad Sci 1971; 182: 258-66.

10- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. ***Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315.*** Antimicrobial Agents Chemotherapy 1999; 43(6): 1449-58.

11- Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. ***Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia.*** J Antimicrob Chemother 2002; 49(5): 793-801.

12- Havaei SA, Moghim S, Shahin M, Azimian A, Ghanbari F, Shokri D. ***A comparison between polymerase chain reaction, oxacillin agar dilusion and cefoxitin disk diffusion methods in detection of methicillin resistance in staphylococcus aureus.*** J Isfahan Med Sch 2013; 31(232): 466-74.

13- Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadian H, Ghaznavi Rad E. ***Comparison of Disk Diffusionand "PCR" methods for determination of Methicillin- resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) strains.*** ISMJ 2012; 17(3): 280-9.

14- Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE, Jr., Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, et al. ***A prospective multicenter study of Staphylococcus aureus bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance.*** Medicine 2003; 82(5): 322-32.

15- Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi S, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, et al. ***Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus in Malaysia.*** J Clin Microbiol 2010; 48(3): 867-72.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

16- Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Van Belkum A, Neela V, et al. ***A simplified multiplex PCR assay for fast and easy discrimination of globally distributed staphylococcaldiscrimination of globally distributed staphylococcal cassette chromosome mec types in meticillinresistant Staphylococcus aureus.*** J Clin Microbiol 2010; 59(pt 10): 1135-9.

17- Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, 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): 217-20.

18- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. ***Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus.*** J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4089-94.

19- Al-Talib H, Yean CY, Al-Khateeb A, Hassan H, Singh KK, Al-Jashamy K, et al. ***A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Panton-Valentine Leucocidin.*** BMC Microbiol 2009; 9: 113.

20- Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. ***Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test.*** J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2766-71.

21- Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatzi F, Kontos F, et al. ***Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the hospitals of central Greece.*** Int J Antimicrob Agents 2001; 18(1): 61-5.

22- Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. ***Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA.*** Indian J Med Microbiol 2009; 27(1): 27-9.

23- Rezaei M, Moniri R, Piroozmand A, MousaviGA. ***Diagnostic value of cefoxitin susceptibility test compared with other diagnostic methods of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.*** Feyz 2013; 17(4): 394-99. [Persian]

24- Ercis S, Sancak B, Hascelik G. ***A comparison of PCR detection of mecA with oxacillin disk susceptibility testing in different media and sceptor automated system for both Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolates.*** Indian J Med Microbiol 2008; 26(1): 21-4.

25- Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M, Shiotani J, et al. ***Microbiological and clinical study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carrying VraS mutation xhanges in susceptibility to glycopeptides and clinical significance.*** Int J Antimicrob Agents 2008; 31(1): 64-70.

26- Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. ***Detection of the antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah.*** J Microbial World 2014; 6(4): 299-311.

27- KianiNia M, Hasani A, Hasani A, Sharifi Y, Mirza Ahmadi S, Dehghani L. ***Investigation and identification of the nuc, fem B mecA and aac(6')/aph(2")-Ia genes in the Staphylococcus aureus isolated from Northwest Iran***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

by multiplex PCR method. J Tabriz Uni Med Sci 2013; 35(1): 68-73. [Persian]

28- Akpaka PE, Kissoon S, Swanston WH, Monteil M. ***Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates from Trinidad & Tobago.*** Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006; 5: 16.

29- Najar Peerayeh SH, Azimian A, Mostafaee M, Siadat D. ***Identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disk diffusion method, determination of MIC and PCR for mecA gene.*** Modares J Med Sci 2009; 12(3): 61-9.

30- Appelbaum PC. ***MRSA the tip of the iceberg.*** Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 2): 3-10.

31- Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ. ***Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone with low-level resistance to oxacillin.*** J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3077-82.

32- Rahbar M, Yaghoobi M, Fattahi A. ***Comparison of different laboratory methods for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus.*** Pak J Med Sci 2006; 22(4): 442-5.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]

Frequency of Methicillin- Resistance among Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus by Phenotypic and Molecular Methods in Yazd

Yousefi A(MSc Student) [1]***, Eslami G(PhD)*** [2]***, Zandi H(PhD)*** [*3]***, Vakili M(PhD)*** [4]

[1] *Department of Microbiology، International campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[2] *Department of Parasitology and Mycology, Research Center for Molecular Identification of Food Hazards, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[3] *Department of Microbiology, Research Center for Molecular Identification of Food Hazards, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

[4]*Department of Public Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran*

Received: 7 Oct 2014 ***Accepted:*** 18 Dec 2014

Abstract

Introduction: Staphylococcus aureus is an important human pathogen which can cause a broad spectrum of diseases including minor skin disease to more severe and aggressive infections. Therefore, this study intended to assess the frequency of methicillin-resistance among clinical isolates of S.aureus by phenotypic and PCR methods in Yazd, Iran.

Methods: In this descriptive-cross sectional study, a total of 114 S. aureus isolates were collected from Different specimens of patients admitted to shahid sadoughi hospital in Yazd, Iran. Antimicrobial susceptibility testing was determined by disk diffusion method (Kirby-Bauer) and minimum inhibitory concentration of oxacillin (MIC) was performed by E.test method. Moreover, PCR method was performed in order to detect mecA gene using specific primers.

Results: Susceptibility testing by disk diffusion method showed that 43 samples (37/7%) and 49 samples(42/1%) were resistant to oxacillin and cefoxitin respectively. MIC results demonstrated that 47(42/1%) samples were resistant to oxacillin. Moreover, 54 samples(47/4%) were found to carry mecA gene using PCR. Highest resistances to antibiotics belonged to ampicillin(99/1 %), penicillin(98/2%), tetracycline(55/3%), erythromycin(37/7%), clindamycin(32/5%), ciprofloxacin (32/5%), ofloxacin (31/6%), gentamicin (26/3%), respectively.

Conclusion: The study findings revealed that the multi-drug resistance (MDR) is prevalent among S.aureus isolates. Furthermore, cefoxitin disks were more useful than oxacillin disks to determine methicillin-resistance by disk diffusion method. However mecA gene was also detected in some samples susceptible to disk diffusion method. PCR technique was proved to be the best method to rapidly identify MRSA.

Keywords: Disk diffusion; Drug resistant; Staphylococcus aureus

This paper should be cited as:

Yousefi A, Eslami G, Zandi H, Vakili M. ***Frequency of methicillin- resistance among clinical isolates of staphylococcus aureus by phenotypic and molecular methods in Yazd***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(1): 1826-37.

Corresponding author: Tel: +98 9123088324, Email: hengameh_zandi@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-22]