مقایسه روش های فنوتیپیک با آنالیز ژن mecA برای تشخیص مقاومت به متی سیلین/اگزاسیلین در ایزوله های کلینیکال استافیلوکوکوس اورئوس در شهر سنندج

دلارام امینی[۱]، فاطمه کشاورزی[۲*]، آزاد فتاحی راد[۳]

۱) گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، سنندج، ایران

۲) گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۳) بیمارستان توحید، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۱۵

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل بیماری زای مهم در عفونت های بیمارستانی و خارج بیمارستانی می باشد. افزایش مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به داروهای آنتی بیوتیک یکی از تمرکزهای بزرگ سلامتی است، و به این ترتیب مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلو کوکوس اورئوس بسیار مهم است و نقش عمده ای در جلوگیری از ایجاد استرین های مقاوم دارد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی مختلف با روش DAD و PCR بررسی شد و آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS و Excel انجام گرفت.

یافته های پژوهش: در روش DAD(۱۱۶/۱۵۰) ۷۷/۳۳ درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین مقاوم بودند و مقاومت نسبت به اگزاسیلین(۷۱/۱۵۰) ۴۷/۳۳ درصد بود. نتایج PCR نشان داد که پرایمر $MR_{3.4}$ برای تشخیص ژن mecA در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین کارآمدتر از پرایمر $MR_{1.2}$ بود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه راهنمایی برای سوق دهی پزشکان به یک درمان هر چه مناسب تر عفونت های استافیلو کوکوس اورئوس در ایران و در نتیجه جلوگیری از بحران بیشتر مقاومت آنتی بیوتیکی در میان استافیلوکوک است. به علاوه این نتایج لزوم تحقیقات بیشتر با نمونه هایی از مکان های بیشتر را جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان می دهند

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR

* **نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج

Email: *Gol.keshavarzi@gmail.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم ترین عوامل ایجادکننده عفونت های اکتسابی بیمارستانی است. سویه های مقاوم به متی سیلین MRSA استافیلو کوک تهدید جدی در عفونت های بیمارستانی به شمار می آیند و روند درمان عفونت های این باکتری را با مشکل مواجه می سازند. اولین بار بروز سویه های MRSA این باکتری در سال۱۹۶۱ از بیمارستان های اروپا گزارش شد،(۱). به دنبال آن فراوانی سویه های MRSA از بسیاری از کشورهای جهان نظیر کانادا، آمریکای شمالی، استرالیا و اروپا نیز گزارش گردید،(۲). متی سیلین نسبت به آنزیم های پنی سیلیناز مقاوم است. مقاومت نسبت به متی سیلین در سویه های MRSA از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی سیلین به نام PBP2a است که تمایل اتصالی بسیار ضعیف به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی دارد،(۳). PBP2aبا ژن mecA رمزگذاری می شود و با کاست بزرگ ژنی متحرک SCCmec منتقل و در کروموزوم سویه های مقاوم قراردارد.(۴)

جهت تشخیص سویه به صورت روتین از روش های فنوتیپیکی از قبیل دیسک آگاردیفیوژن در آزمایشگاه های میکروبیولوژی استفاده گسترده ای می شود،(۵). با این حال از مشکلات روش های فنوتیپیک این است که تحت تاثیر عواملی نظیر دما و PH و Nacl محیط نتایج ممکن است تغییر کند. لذا تکنیک های مولکولی امروزه در کنار روش های فنوتیپیک نتایج مطمئنی را به همراه داشته است،(۶). با روش های متعدد PCR شناسایی ژن mecA توسعه یافته است. اگر چه برای شناسایی ژن mecA با PCR ۲ پرایمر(MR1,2) و (MR3,4) به طور متعدد توسط برخی از محققین استفاده شده است ولی پرایمر(MR3,4) که 533bp دارد نسبت به پرایمر(MR1,2) که 154bp دارا می باشد حساسیت و ویژگی بالایی دارد و برای تشخیص ژن mecA کارآمدتر است. تشخیص آزمایشگاهی و تعیین تنوع این سویه های مهم از نظر پزشکی در درمان، حذف و پیشگیری از عفونت های بیمارستانی خیلی مهم می باشند. از اهداف این تحقیق بررسی فراوانی MRSA با دو روش انتشار دیسک و PCR برای ژن های MR1,2, MR3,4, NUC1,2 در استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از نمونه های مختلف بالینی در شهرستان سنندج است.

مواد و روش ها

جمع آوری ایزوله های میکروبی: صد و پنجاه سویه استافیلوکوکوس اورئوس از ایزوله های کلینیکال در فاصله سال ۱۳۹۱ تا دی ماه ۱۳۹۲ در شهر سنندج جمع آوری شد. برای تعیین هویت نمونه ها از روش های معمول(کوکسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت، رشد در مانیتول سالت آگار و DNase مثبت) استفاده شد. تولید کواگولاز نیز با استفاده از پلاسمای سیتراته خرگوش روی لام انجام گرفت. جهت تعیین مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس از محیط کشت مولرهینتون آگار و دیسک های آنتی بیوگرام استفاده شد و نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

استخراج DNA: برای استخراج DNA باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس چند کلنی از کلنی های رشد کرده بر روی محیط کشت مولرهینتون با کمک لوپ برداشت شد و در میکروتیوب های حاوی۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط گردید. میکروتیوب ها به مدت یک دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ قرار داده شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزین به رسوب سفید رنگ اضافه شد و ۲۰ ثانیه ورتکس شد. به این محلول ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوبی اضافه و ۵ ثانیه ورتکس گردید. محلول با سمپلر به ستون اسپین منتقل شد و داخل میکروتیوپ دیگر قرار گرفت. میکروتیوب ها در دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روئی داخل میکروتیوب دور ریخته شد و ستون اسپین در میکروتیوب دیگری قرار داده شد و به آن ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشو شماره یک اضافه شد. سپس میکروتیوب ها در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه قرار داده شدند. مایع داخل میکروتیوب دور ریخته شد و ستون اسپین میکروتیوب دیگری قرار داده شد و به آن ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشو شماره دو اضافه شد. میکروتیوب ها در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه قرارداده شدند و این کار چند بار تکرار گردید.

ستون اسپین در میکروتیوپ دیگر قرار داده شد و ۳۰ میکرولیتر محلول شستشو به آن اضافه شد و ۵-۳ دقیقه در انکوباتور در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، سپس در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه قرار داده شدند. تیوب حاوی DNA در فریزر دمای۲۰ - درجه سانتی گراد قرار داده شد.

PCR: در جدول شماره ۱ لیست پرایمرهای مورد استفاده ذکر شده است. برای هر واکنش زنجیره ای پلیمراز ابتدا یک ماستر میکس حاوی بافر 10X، Mgcl2، dNTP و آب مقطر دو بار تقطیر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

طبق دستورالعمل رایج ساخته شد و سپس به آن در هر واکنش پرایمرها، DNA ژنومی و آنزیم Taq Polymerase به مقادیر لازم اضافه شد.

برنامه PcR برای ژن های MR1,2 و MR3,4 و NUC1,2 که به دستگاه ترموسایکلر داده شد در جداول شماره ۲ تا ۴ ذکر شده است.

جدول شماره ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Name	Sequence	Amplicon size
MR1(F)	5-TAGAAATGACTGAACGTCCG-3	154 BP
MR2(R)	5-TTGCGATCAAATGTTACCGTAG-3	
MR3 (F)	5-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3	533BP
MR4 (R)	5-AGTTCTGCAGTACCGGATTTTGC-3	
NUC1 (f)	5-GCGATTGATGGTGTGATACGGTT-3	278BP
NUC2 (R)	5-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3	

جدول شماره ۲. مراحل PcR ژن MR1,2

Initial denaturation	94 ^{oc}, 5 min
Cycling (30 cycles)	Denaturation: 94 ^{oc}, 30 s Annealing: 56-60^{oc}, 30s Extension: 72 ^{oc} , 30S
Final extension	72 ^{oc} , 10 min

جدول شماره ۳. مراحل PcR ژن MR3,4

Initial denaturation	94 ^{oc}, 5 min
Cycling (30 cycles)	Denaturation: 94 ^{oc}, 30 s Annealing: 53-57 ^{oc}, 30s Extension: 72 ^{oc}, 1 min
Final extension	72 ^{oc}, 10 min

جدول شماره ٤. مراحل PcR ژنNUC1,2

Initial denaturation	94 ^{oc}, 5 min
Cycling (34 cycles)	Denaturation: 94 ^{oc}, 1min Annealing: 56-60 ^{oc}, 1 min Extension: 72 ^{oc}, 1 min
Final extension	72 C ^{oc}, 10 min

یافته های پژوهش

نتایج تست آنتی بیوگرام: آنتی بیوگرام برای ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. نتایج آنتی بیوگرام با CLSI(جدول شماره ۵) مقایسه شد و بر اساس حساس و نیمه حساس و مقاوم نتایج به دست آمد.(جدول شماره ۶) از ۱۵۰ نمونه تعداد(۷۷/۳۳ درصد)۱۱۶ سویه مقاوم به متی سیلین و (۴۷/۳۳ درصد)۷۱ سویه به اگزاسیلین مقاومت داشتند.(نمودار شماره ۱)

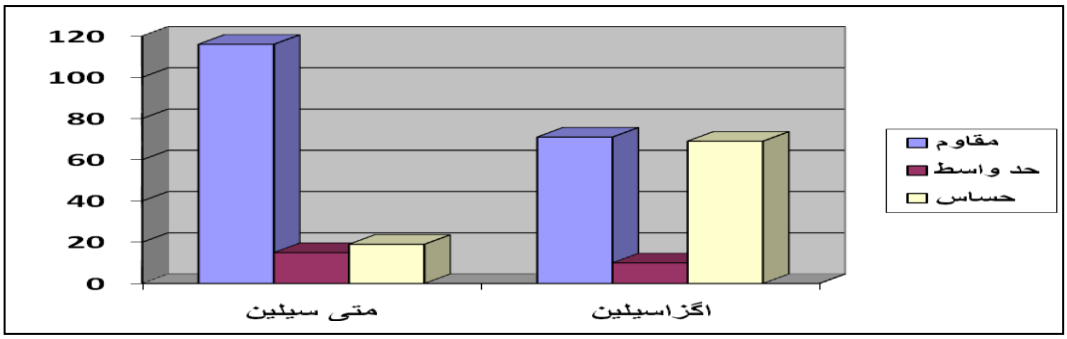
جدول شماره ۵. جدول CLSI

	R	I	S
Oxacillin	≤10mm	۱۱-۱۲mm	≥۱۳mm
Methicillin	≤9mm	۱۰-۱۳mm	≥۱۴mm

جدول شماره ٦. نتایج آنتی بیوگرام در ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس

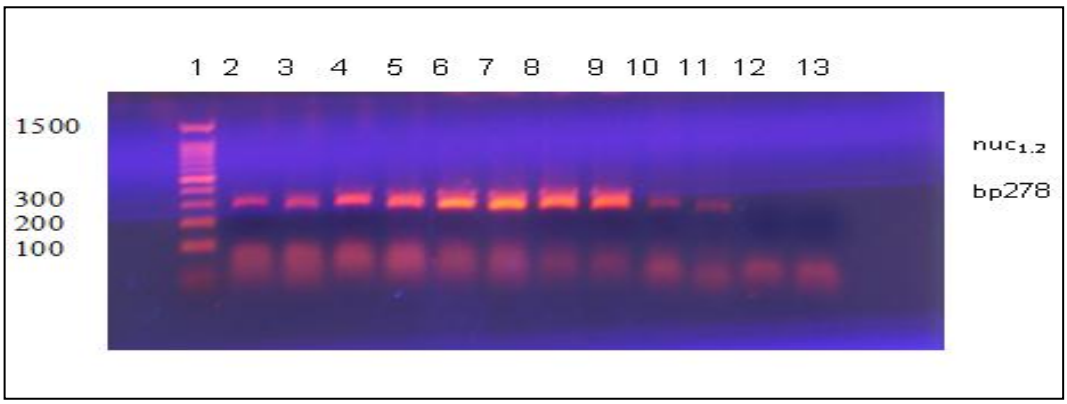
آنتی بیوتیک	مقاوم(Resistant)		حد واسط(Intermediate)		حساس(Sensetive)	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
متی سیلین	۷۷/۳۳	۱۱۶	۱۰	۱۵	۱۲/۶۶	۱۹
اگزاسیلین	۴۷/۳۳	۷۱	۶/۶	۱۰	۴۶	۶۹

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

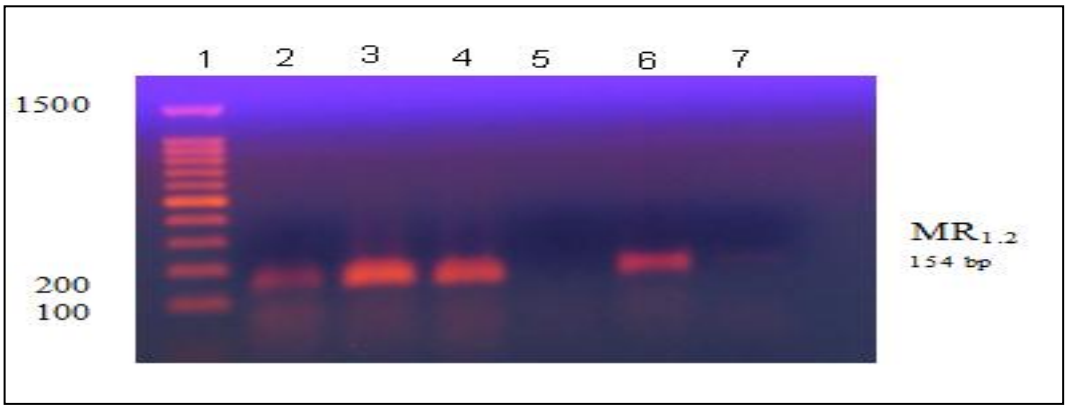


نمودار شماره ۱. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی

نتایج PCR: نتایج PCR ژن NUC1,2، MR3,4 و MR1,2 ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که تعداد ۸۳ سویه از نظر حتضور NUC1,2و ۱۰۸سویه از نظر ژن MR1,2 و ۱۳۸ سویه برای ژن MR3,4 مثبت بودند.(شکل های شماره ۱ تا ۳)

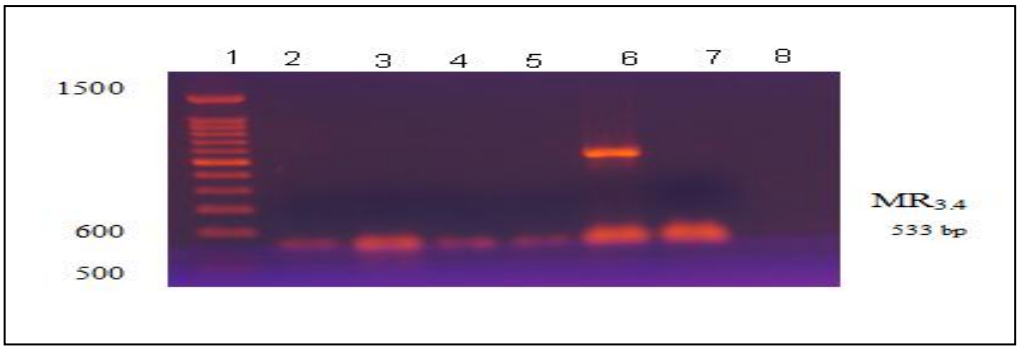


شکل شماره ۱. تکثیر ژن nuc1,2 در سویه استافیلوکوکوس اورئوس(ستون شماره ۱ سایز مارکر bp ۱۰۰، ستون شماره ۱۱-۲ نمونه های مثبت بالینی و ستون شماره ۱۲ و ۱۳ کنترل منفیmastermix+primer)



شکل شماره ۲. تکثیر ژن MR1,2 در سویه استافیلوکوکوس اورئوس(ستون شماره ۱ سایز مارکر bp ۱۰۰، ستون های شماره ۲ و ۳ و ٤ و ٦ نمونه های مثبت بالینی دارای ژن MR1,2، ستون شماره ٥ نمونه بالینی فاقد ژن MR1,2، ستون شماره ۷ کنترل منفی mastermix+primer)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]



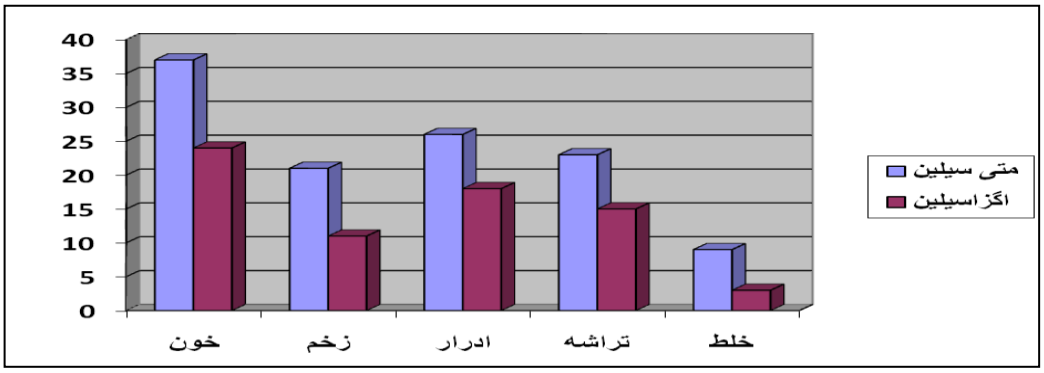
شکل شماره۳ . تکثیر ژن MR3,4 در سویه استافیلوکوکوس اورئوس(ستون شماره ۱ سایز مارکر ۱۰۰bp، ستون شماره ۷-۲ نمونه های مثبت بالینی، ستون شماره ۸ کنترل منفی masrermix+primer)

مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

در جدول شماره ۴ و نمودار شماره ۲ مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی به تفکیک بیان شده است. بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین در نمونه خون[۳۷(۲۴/۶ درصد)] و کمترین مقاومت آن در خلط[۹(۶ درصد)] بود.(جدول شماره ۷)

جدول شماره ۷ . مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده در آزمایش انتشار دیسک

نمونه دیسک	خون	زخم	ادرار	تراشه	خلط	تعداد کل
متی سیلین	۳۷(۲۴/۶ درصد)	۲۱(۱۴ درصد)	۲۶(۱۷/۳ درصد)	۲۳(۱۵/۳درصد)	۹(۶ درصد)	۱۱۶(۷۷/۳۳ درصد)
اگزاسیلین	۲۴(۱۶ درصد)	۱۱(۷/۳ درصد)	۱۸(۱۲ درصد)	۱۵(۱۰ درصد)	۳(۲ درصد)	۷۱(۴۷/۳۳ درصد)



نمودار شماره ۲. مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده در آزمایش انتشار دیسک

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SPSS

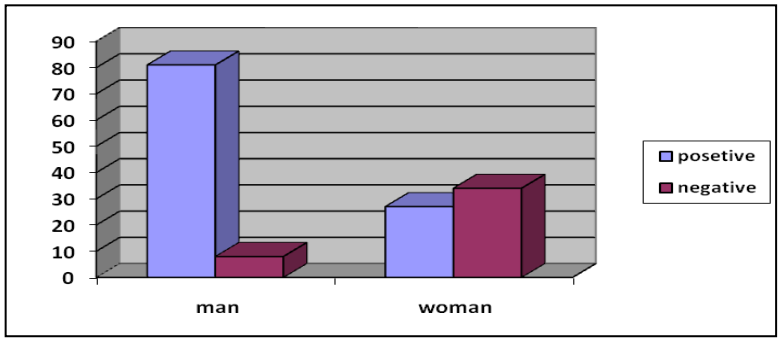
ارتباط میان جنسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه استافیلوکوکوس اورئوس: جهت بررسی این رابطه از آزمون آماری کای اسکوئر استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون در جداول(شماره ۸ تا ۱۰ و نمودارهای شماره ۳ تا ۵) زیر آمده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

جدول شماره ۸. نتایج PCR ژن MR1,2 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

Crosstab				
		MR1.2		Total
		+	-	
sex	MAN	81	8	89
	WOMAN	27	34	61
Total		108	42	150

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	39.236[a]	1	.000
Continuity Correction[b]	36.951	1	.000
Likelihood Ratio	40.322	1	.000
Fisher's Exact Test			
Linear-by-Linear Association	38.974	1	.000
N of Valid Cases	150		



نمودار شماره ۳. نتایج PCR ژن MR1,2 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

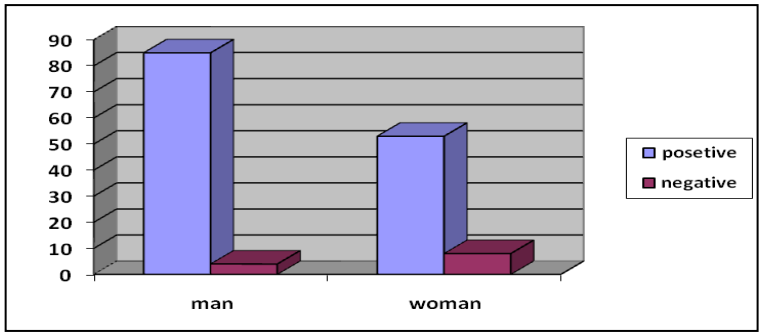
جدول شماره ۹. نتایج PCR ژن MR3,4 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

Crosstab				
		MR3.4		Total
		+	-	
sex	MAN	85	4	89
	WOMAN	53	8	61
Total		138	12	150

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.654[a]	1	.056
Continuity Correction[b]	2.577	1	.108
Likelihood Ratio	3.590	1	.058
Fisher's Exact Test			
Linear-by-Linear Association	3.630	1	.057
N of Valid Cases	150		

Df: درجه آزادی، Pvalue:Asymp. Sig. (2-sided) , a: یک متغییر b: متغییر دیگر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

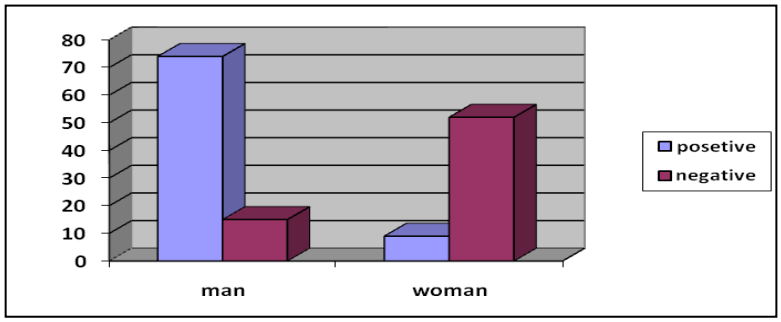


نمودار شماره ٤. نتایج PCR ژن MR3,4 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

جدول شماره ۱۰. نتایج PCR ژن NUC1,2 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

Crosstab				
		NUC1.2		Total
		+	-	
sex	MAN	74	15	89
	WOMAN	9	52	61
Total		83	67	150

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	68.497[a]	1	.000
Continuity Correction[b]	65.757	1	.000
Likelihood Ratio	74.453	1	.000
Fisher's Exact Test			
Linear-by-Linear Association	68.040	1	.000
N of Valid Cases	150		



نمودار شماره ۵. نتایج PCR ژن NUC1,2 با استفاده از آزمون کای دو به تفکیک جنسیت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

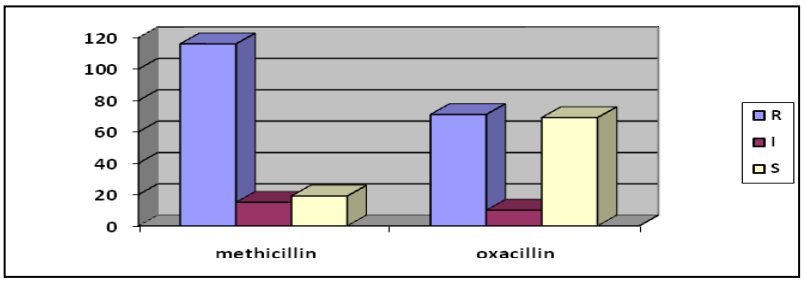
ارتباط میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین بر اساس سویه های مقاوم، حد واسط و حساس استافیلوکوکوس اورئوس: جهت بررسی این رابطه از آزمون آماری کای اسکوئر استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۱۱ و نمودار شماره ۶ آمده است

چون سطح معناداری آزمون زیر P<0.05 به دست آمده است، بنا بر این بین دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین بر اساس سویه های مقاوم، حد واسط و حساس استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط آماری معنی داری وجود دارد.

جدول شماره ۱۱. ارتباط میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین

		oxacillin			Total
		R	I	S	
methicilline	R	71	10	35	116
	I	0	0	15	15
	S	0	0	19	19
Total		71	10	69	150

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	51.612[a]	4	.000
Likelihood Ratio	64.925	4	.000
Linear-by-Linear Association	42.483	1	.000
N of Valid Cases	150		



نمودار نمودار ٦: ارتباط میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین

ارتباط میان ژن NUC بر اساس مقاومت به اگزاسیلین: جهت بررسی این رابطه از آزمون آماری کای اسکوئراستفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون درجدول شماره ۱۲ و نمودار شماره ۷ آمده است.

چون سطح معناداری آزمون زیرP<0.05 به دست آمده است، بنا براین میان ژن NUC بر اساس مقاومت به اگزاسیلین ارتباط آماری معنی داری وجود دارد

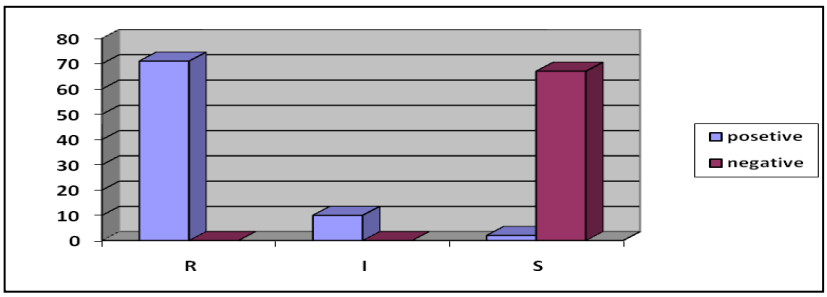
.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

جدول شماره ۱۲. ارتباط میان ژن NUC بر اساس مقاومت به اگزاسیلین

oxacilin * NUC Crosstabulation				
		NUC		Total
		+	−	
oxacilin	R	71	0	71
	I	10	0	10
	S	2	67	69
Total		83	67	150

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	142.142[a]	2	.000
Likelihood Ratio	188.129	2	.000
Linear-by-Linear Association	132.353	1	.000
N of Valid Cases	150		



نمودار شماره ۷. ارتباط میان ژن NUC بر اساس مقاومت به اگزاسیلین

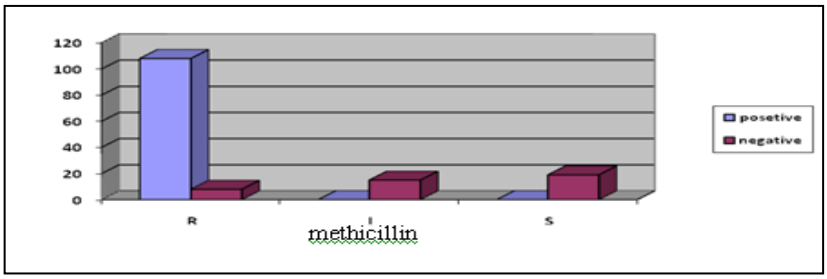
ارتباط میان ژن MR1,2 بر اساس مقاومت به متی سیلین: جهت بررسی این رابطه از آزمون آماری کای اسکوئر استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۱۳ و نمودار شماره ۸ آمده است. چون سطح معناداری آزمون زیر $P<0.05$ به دست آمده است، بنا بر این میان ژن MR1,2 بر اساس مقاومت به متی سیلین ارتباط آماری معنی داری وجود دارد.

جدول شماره ۱۳. ارتباط میان ژن MR1,2 بر اساس مقاومت به متی سیلین

methicilline * $MR_{1,2}$ Crosstabulation				
		$MR_{1.2}$		Total
		+	−	
methicilline	R	108	8	116
	I	0	15	15
	S	0	19	19
Total		108	42	150

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	68.478[a]	2	.000
Likelihood Ratio	85.519	2	.000
Linear-by-Linear Association	63.762	1	.000
N of Valid Cases	150		

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]



نمودار شماره ۸. ارتباط میان ژن $MR_{1,2}$ بر اساس مقاومت به متی سیلین

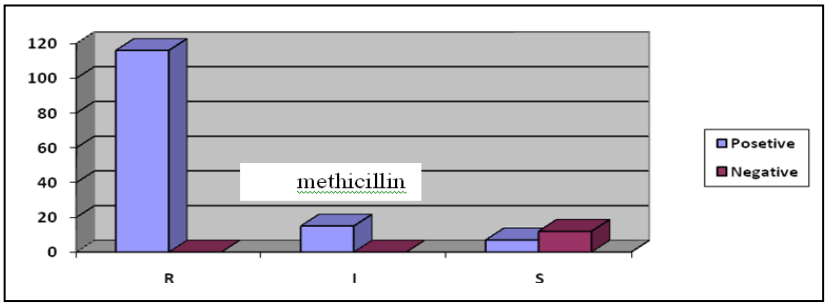
ارتباط میان ژن $MR_{3,4}$ بر اساس مقاومت به متی سیلین

جهت بررسی این رابطه از آزمون آماری کای دو استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۱۴ و نمودار شماره ۹ آمده است. چون سطح معناداری آزمون زیر $P<0.05$ به دست آمده است، بنا بر این میان ژن $MR_{3,4}$ بر اساس مقاومت به متی سیلین ارتباط آماری معنی داری وجود دارد.

جدول شماره ۱٤. ارتباط میان ژن $MR_{3,4}$ بر اساس مقاومت به متی سیلین

meticiline * $MR_{3,4}$ Crosstabulation				
		$MR_{3,4}$		Total
		+	–	
meticiline	R	116	0	116
	I	15	0	15
	S	7	12	19
Total		138	12	150

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	89.931[a]	2	.000
Likelihood Ratio	58.623	2	.000
Linear-by-Linear Association	72.914	1	.000
N of Valid Cases	150		



نمودار شماره ۹. ارتباط میان ژن $MR_{3,4}$ بر اساس مقاومت به متی سیلین

میزان ارتباط میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین: جهت بررسی این رابطه از آزمون ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمون در جداول شماره ۱۵ و ۱۶ آمده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

جدول شماره ۱۵. میزان ارتباط میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین

Correlations				
			meticiline	oxacilin
Spearman's rho	meticiline	Correlation Coefficient	1.000	.563**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	150	150
	oxacilin	Correlation Coefficient	.563**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	150	150

سطح معنی داری**

چون سطح معناداری آزمون زیر $P<0.05$ به دست آمده است، بنا بر این میان دو آنتی بیوتیک متی سیلین/اگزاسیلین ارتباط آماری معنی داری وجود دارد. میزان این رابطه ۰/۵۶۳ می باشد.

جدول شماره ۱۶. میزان ارتباط میان ژن $MR1_{1,2}$ و $MR_{3,4}$ و $NUC_{1,2}$

Correlations						
				$MR_{1.2}$	$MR_{3.4}$	$NUC_{1.2}$
Spearman's rho		$MR_{1.2}$	Correlation Coefficient	1.000	.473**	.694**
			Sig. (2-tailed)	.	.000	.000
			N	150	150	150
		$MR_{3.4}$	Correlation Coefficient	.473**	1.000	.328**
			Sig. (2-tailed)	.000	.	.000
			N	150	150	150
1.000	.328**	.694**	Correlation Coefficient			$NUC_{1.2}$
-	.000	.000	Sig. (2-tailed)			
150	150	150	N			

سطح معنی داری**

بحث و نتیجه گیری

بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشکلات فراوانی در درمان بیماران ناشی از این ارگانیسم در نقاط مختلف جهان از جمله ایران ایجاد کرده است. جهت درمان مناسب و کنترل عفونت های بیمارستانی نیاز به دانستن الگوی مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. متاسفانه اطلاعات مناسبی در مورد میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های مختلف در ایران وجود ندارد. هدف مطالعه ما، بررسی میزان مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های رایج و راهنمایی جهت درمان مناسب بیماری های استافیلوکوکی و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم در جامعه می باشد. نتایج این مطالعه میزان مقاومت به متی سیلین و اگزاسیلین را به ترتیب ۷۷/۳۳ درصد و ۴۷/۳۳ درصد نشان داد که این میزان مقاومت مشابه به درصد شیوع این سویه ها در بیمارستان های بزرگ شرق آسیا،(۷،۸)، و بیشتر از کشورهای شمال اروپا و خاورمیانه(به جزء بیمارستان های بزرگ عربستان) می باشد،(۹)، البته این میزان مقاومت از گزارش میمشی و همکاران کمتر است،(۱۰). نتایج این بررسی نشان داد ۱۰۸ نمونه از ۱۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن MRSA و ۱۳۸ سویه دارای ژن MR3,4 بودند، به علاوه کارایی پرایمر MR3,4 نسبت به پرایمر MR1,2 بیشتر بود. در مطالعات انجام شده در اسپانیا در سال ۲۰۰۲ میزان عفونت های ناشی ازMRSA ۲۴/۵ درصد و در ایرلند، ایتالیا و فرانسه به ترتیب ۴۱/۴ درصد، ۴۰/۱ درصد و ۳۳ درصد گزارش شده است،(۱۱،۱۲). در مطالعه ای دیگر که در تایوان انجام شده است میزان عفونت های MRSA ۷۷ درصد گزارش شده است،(۱۳). در ایزوله های مقاوم به اگزاسیلین در کل ۲ الگوی آنتی بیوگرام مشاهده شد، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های MRSA و Methicillin Sensitive MSSA(Staphylococcus Aureu) که متفاوت از یکدیگر هستند به طوری که ایزوله های MSSA برخلاف MRSA نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها حساس اند که مشابه مطالعه Tiwari است،(۱۴،۱۵). این اختلافات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

احتمالاً به دلیل استفاده از روش DAD به تنهایی است. اختلاف مشاهده شده بین نتایج DAD و PCR احتمالاً ناشی از وجود سویه هایی با حساسیت نسبی نسبت به اگزاسیلین می باشد که در روش DAD به صورت حساس نسبی گزارش می شوند ولی حاوی ژن MRSA هستند. در این مطالعه مقاومت به اگزاسیلین با روش DAD ۴۷/۳۳ درصد بود. روش استاندارد برای شناسایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین PCR می باشد. مقاومت سویه ای MRSA به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک های بتالاکتام در ایران می باشد. با ظهور مقاومت به اگزاسیلین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس میزان مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها نیز به شدت بالا رفته است. این امر احتمالاً می تواند بیانگر ارتباط بین ظهور مقاومت به اگزاسیلین و متی سیلین و مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها باشد. در مطالعه ای دیگر افزایش حداقل غلظت مهار کنندگی در برابر اگزاسیلین و کاهش حساسیت نسبت به دیگر عوامل آنتی بیوتیکی، درمان و مهار انتقال عفونت های بیمارستانی ناشی از MRSA را با چالش بسیار بزرگی روبه رو ساخته است و سویه های MRSA در بیمارستان های مورد مطالعه از گستردگی بالایی برخوردار می باشد،(۱۶). طبق آمارهای موجود در ایالات محتده میزان شیوع MRSA از ۲ درصد در سال ۱۹۸۰ به ۶۰ درصد در سال ۲۰۰۴ افزایش یافته است،(۱۷). در کشورهای اروپایی این رقم به کمتر از ۱ درصد در هلند و اسکاندیناوی و به ۳۷ درصد در انگلستان و لهستان و بیش از ۵۰ درصد در پرتقال و ایتالیا رسیده است،(۱۸). متفاوت بودن میزان مقاومت به متی سیلین در گزارشات مختلف می تواند ناشی از تفاوت در مدت زمان استفاده از این دارو و روش های مختلف انجام آزمایشات سنجش مقاومت جمعیت های متنوع مورد مطالعه و بررسی بر روی بیماران با سابقه
متفاوت آنتی بیوتیک در مانی باشد. این مسئله می تواند مربوط به پیدایش موتاسیون در ژن مقاومت به متی سیلین در بین این سویه ها با وجود تفاوت های فیزیولوژیکی مانند تغییر در دیواره باکتری باشد،(۱۹). مقاومت بالای آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در بیماران بیمارستانی می تواند در نتیجه مصرف نادرست آنتی بیوتیک ها و رعایت نکردن اصول بهداشتی در محیط بیمارستانی و در بین کارکنان و پرسنل بیمارستان باشد. از این رو لزوم تشخیص به موقع و صحیح این سویه به خصوص در محیط های بیمارستانی احساس می شود. با در دست داشتن الگوی مقاومت سویه های MRSA می توان قدم های موثری در جهت کنترل روند مقاومت این سویه ها و جلوگیری از شیوع بیشتر عفونت های ناشی از آن ها شد،(۲۰). تحقیقات نشان می دهد دلایل تفاوت های موجود در نتایج بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی بسیار متنوع می باشد. بسیاری از جمعیت های استافیلوکوکوس در مقاومت به متی سیلین هتروژن هستند و بسته به درصد هتروژینیسیتی کشت نتایج تست های فنوتیپی ممکن است متغیر باشد. برای مثال سطح مقاومت به متی سیلین به فاکتورهای محیطی مثل دما، اسمولاریته، در دسترس بودن کاتیون های دو ظرفیتی و ترکیبات محیط رشد بستگی دارد،(۲۱)، و در انجام فعالیت های آزمایشگاهی یا افزودن NACL ۲ درصد و پایین آوردن دمای گرماگذاری تا ۳۵ درجه سانتی گراد برای افزایش بیان مقاومت استفاده می شود. هم چنین فنوتیپ مقاوم در نتیجه حذف یا جهش نقطه ای در بخش های مختلف ژن mec A و یا تغییر در جایگاه اتصال دارو، کاهش یا افزایش می یابد. روش های فنوتیپی تحت تاثیر عوامل محیطی است و برخی از استافیلوکوکوس ها فاقد ژن مقاومت به متی سیلین هستند ولی به دلیل ترشح زیاد بتالاکتاماز در محیط کشت به صورت کاذب به عنوان سویه های مقاوم شناسایی می شوند. استفاده از روش های ژنتیک مولکولی برای نشان دادن حضور ژن های ویرولانس و مقاومت در باکتری ها بسیار معمول است و در جهت تشخیص سریع به کار می رود. حضور ژن مقاومت در میکروارگانیسم نشان دهنده فنوتیپ مقاومت نیست. در حقیقت بیان ژن مقاومت تحت کنترل شرایط مختلف محیطی و احتمالاً ژن های دیگری است که تعیین کننده سرنوشت فنوتیپ مقاومت هستند،(۲۲). فراوانی بالای سویه های MRSA و هم چنین مقاومت هم زمان آن ها به سایر آنتی بیـوتیـک ها می تواند عواقب شدیدی داشته باشند
زیرا گسترش این سویه ها به بخش هایی مانند نوزادان، شیمی درمانی و ICU هزینه های زیادی را در پی خواهد داشت.

برای درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA تجویز آنتی بیوتیک های متی سیلین و اگزاسیلین مناسب نیست زیرا مقاومت این باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام معمول است و نباید با تجویز این آنتی بیوتیک ها سبب ایجاد مقاومت در این باکتری ها شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پرایمر $MR_{3,4}$ نسبت به پرایمر $MR_{1,2}$ حساسیت و ویژگی بالایی دارد و پرایمر $MR_{3,4}$ برای تشخیص ژن mecA کارآمدتر است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

References

1.MacKinnon MM, Allen KD. Long-term MRSAcarriage in hospital patients. J Hospital Infect 2007;46:216-21.

2.Embil J. Methicillin-resistant Staphylococcusaureus in tertiary care institutions on the Canadian prairies. J Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15:646-51.

3.Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin resistant Staphylococcus aureus infections among patients in the emergency department. N Engl J Med 2006; 355: 666-74.

4.Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning andnucleotide sequence determination of the entiremec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcusaureus N315. J Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1449-58.

5.Rahbar M, Yaghoobi M, Fattahi A. Comparisonof Different laboratory Methods for Detectionof Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. Pak J Med Sci 2006; 22: 442-5.

6.Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta-lactamantibiotics in strains of Staphylococcus aureus. J Ann Intern Med 1982; 97: 339-44.

7.Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerasechain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 2240-44.

8.Westh H, Zinn CS, Rosdahl VT. An Internationalmulticenter study of antimicrobial consumption andresistance in staphylococcus aureus isolates from 15hospitals in 14 countries. J Microb Drug Resistance 2004; 10: 169-76.

9.Durmaz B, Durmaz R, Sahin K. Methicillin-resistanceamong Turkish isolates of Staphylococcus aureus strains from nosocomial and community infections and theirresistance patterns using various antimicrobial agents. J Hosp Infect 1997;5: 325-9.

10.Austin TW, Austin MA, McAlear DE, Coleman BT, Osoba AO, Thaqafi AO, et al. MRSA prevalence in ateaching hospital in Western Saudi Arabia. J Saudi Med 2003; 24: 1313-6.

11.Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2000; 38: 2170-3.

12.Oteo J, Baquero F, Vindel A, Campos J. Antibiotic resistance in 3113 blood isolate ofStaphylococcus aureus in 40 Spanish hospitalsparticipating in the European antimicrobialresistance surveillance system. J Antimicrob Chemother 2004; 53:1033-8.

13.Huang H, Flynn MN, King HJ, Monchaud C, Morita M, Cohen HS. Comparisons of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and hospital-associated MSRA infections in Sacramento, California. J Clin Microbiol 2006; 44:2423-7.

14.Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, UdoE, Aligholi M, Modarressi MH, et al. Staphylococcalcassette chromosome mec (SCCmec) analysis and antimicrobial susceptibility patterns ofmethicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA) isolates in Tehran, Iran. J Microb Drug Resist 2008;14: 217-20.

15.Tiwari HK, Das AK, Sapkota D, Sivrajan K, Pahwa VK. Methicillin resistant Staphylococcus aureus:prevalence and antibiogram in a tertiary care hospital in western Nepal. J Infect Dev Ctries 2009; 3:681-4.

16.Saderi H, Oliya P, Zafarghandi N, JalaliNadoushan M. [Survey antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus isolated from Shahed University hospital's personnel nose]. J Mazandaran Uni Med Sci 2004;14: 69-75. (Persian)

17.Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, PluisterGN, Willems RJ, De Neeling AJ. Widespread dissemination in The Netherlands of theepidemic berlin methicillin-resistant Staphylococcusaureus clone with low-level resistanceto oxacillin. J Clin Microbiol 2004;42;3077-82.

18.Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D,Nuebel U. Methicillin Resistatnt Staphylococcus aureus containing the panton valentineleukocidin in 2005 and 2006. J Antimicrob Chemother 2007 ; 60: 1258-63.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]

19.Zinn CS, Westh H, Rosdahl VT. An internationalmulticenter study of antimicrobial resistance andtyping of hospital staphylococcus aureus isolates from21 laboratories in 19 countries or states. J Microbial Drug Resist 2004; 10:160-8.

20.Wang JT, Chen YC, Yang TL, Chang SC. Molecular epidemiology and antimicrobialsusceptibility of methicillin-resistant Staphylococcusaureus in Taiwan. J Diagn MicrobiolInfect Dis 2002; 42: 199-203.

21.Udo EE, Al-Sweih R, Dahr TS, Dimitrov EM, Mokaddas M, Johny IA, et al. Survaillance of antibacterial resistance inStaphylococcus aureus isolated in Kuwaithospitals. Med Prink Pract 2008; 17:71-5.

22.Kotilainen P, Routamaa M, Peltonen R, Oksi J, Rintala E, Meurman O, et al. Elimination of epidemic Methicillin resistant Staphylococcus aureus from a university hospital and district institutions, Finland. J Emerg Infect Dis 2003;9:169-75.

Comparison Phenotypic Methods with mecA Gene Analysis for the Detection of Methicillin/Oxacillin Resistance in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus in Sanandaj City

Amini D[1], Keshavarzi F[2], Fattahy Rad A[3]*

(Recived: August 10, 2013 Accepted: November 6, 2013)

Abstract

Introduction: Staphylococcus aureus is one of the most important agents of many hospital and nonhospital infections. Increasing Staphylococcus aureus resistance to antibacterial drugs is one of the major health concerns. Therefore, studying antibiotic resistance of Staphylococcus aureus is very important and it has a main role in preventing the creation of resistant strains.

Materials & Methods: The antibiotic resistance of 150 Staphylococcus aureus isolated from various clinical specimens was determined by disk agar diffusion (DAD) and polymerase chain reaction (PCR) methods. Statistical analysis of data was performed by SPSS and Microsoft Office Excel softwares.

Findings: Using the DAD method, 77/33% (116/150) of the Staphylococcus aureus isolates were resistant to Methicillin and 47/33% (71/150) were resistant to oxacillin. The results indicated that primer $MR_{3,4}$ was more appropriate than primer $MR_{1,2}$ for the detection of mecA gene in MRSA.

Discussion & Conclusion: The results of this study can provide guidance for physiccians towards a more appropriate treatment of Staphylococcus aureus infections in Iran. Thereby, it is preventing the emergence of further antibiotic resistance among Staphylococcus aureus. Our results also revealed the need for further investigations using a higher number of specimens representing a wider variety of locations to determine the antibiotic resistance patterns in our state more precisely.

Keywords: Staphylococcus aureus, antibiotic resistance, PCR.

1.Dept of Biology, Kurdistan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2.Dept of Biology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
3.Taohid Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, , Sanandaj, Iran
**(Corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-12-23]