

## بررسی فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین (*mec-A*) در سویه های مختلف استافیلوکوک اورئوس با PCR و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن

دکتر علیرضا زمانی\*، دکتر سیاوش صادقیان\*\*، دکتر محمد نجفی مصلح\*\*\*، دکتر محمدتقی گودرزی\*\*\*\*  
دکتر رسول یوسفی مشعوف\*\*، جلال قادرخانی\*\*\*\*\*

دریافت: ۸۵/۹/۱۴، پذیرش: ۸۶/۳/۲۱

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین یک پاتوژن عمده و مهم در ایجاد بیماری و مرگ و میر در ایران و جهان است. به دلیل شیوع روز افزون مقاومت به اغلب آنتی بیوتیک های رایج، درمان و مبارزه علیه آن بسیار مشکل شده است. بنابراین هدف این مطالعه تعیین فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین و بررسی الگوی حساسیت ضد میکروبی سویه های مختلف استافیلوکوک می باشد.

**روش کار:** این پژوهش توصیفی در سال ۱۳۸۴ بر روی ۷۰ مورد استافیلوکوک اورئوس جداسازی شده از بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان و یک آزمایشگاه خصوصی با تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) صورت گرفت. در کنار آن سنجش حساسیت ضد میکروبی ایزوله ها به روش دیسک آگار دیفیوژن انجام و اطلاعات بدست آمده تجزیه و تحلیل گردیدند.

**نتایج:** یافته های این بررسی به روش PCR نشان داد که از ۷۰ ایزوله بدست آمده، ۵۰ درصد سویه ها (۳۵ مورد) ژن مقاومت به متی سیلین را نشان می دهند. ولی در بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک آگار دیفیوژن، فقط ۳۱/۴ درصد سویه ها (۲۲ مورد) مقاومت به متی سیلین/اگزاسیلین را نشان می دادند. مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در میان سویه های مقاوم به متی سیلین نسبت به آنتی بیوتیک های دیگر نیز همانند پنی سیلین (۱۰۰)، کلواگزاسیلین (۹۱/۴)، تتراسایکلین (۷۴/۲)، کوتریموکسازول (۶۸/۵)، اریترومایسین (۶۸/۵) و سفنازیدیم (۵۱/۴) مشاهده گردید. در مقابل، سویه های استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین به جز پنی سیلین (مقاومت کامل)، حساسیت ضد میکروبی بالای ۸۰ درصد را نسبت به پانل آنتی بیوتیکی نشان می دادند.

**نتیجه نهایی:** نتایج این پژوهش نشان داد که بروز سویه های مقاوم به متی سیلین در مراکز درمانی همدان به سطح ۵۰ درصد رسیده است که علاوه بر آن مقاومت چند داروئی نیز نشان می دهند.

/ / / :

\* استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (zamanialireza@yahoo.com)

\*\* دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\* استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\*\* استاد گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\*\*\* کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

**مقدمه :**

در سال ۱۹۶۱ اولین سویه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus=MRSA) در اروپا شناسایی شد. از آن زمان تاکنون و به ویژه طی دو دهه گذشته شیوع این سویه در بسیاری از قسمت های جهان افزایش یافته است (۱). این سویه علاوه بر اینکه یکی از شایع ترین عوامل عفونت های بیمارستانی می باشد به بسیاری از آنتی بیوتیکها، از جمله بتا لاکتام ها، پنی سیلین های نیمه سنتتیک، سفالوسپورین ها، کارباپنم ها و پنم ها مقاومت نشان می دهد. لذا مهم است که بدانیم عفونت های ناشی از MRSA با اهمیت بوده و می توانند حتی باعث مرگ بیماران مبتلا شوند. بنابراین افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی یک نگرانی محسوب شده و باید همیشه کنترل گردد. مقاومت به متی سیلین مستقل از تولید آنزیم بتا لاکتاماز بوده و شیوع آن در کشور ها و زمان های مختلف متفاوت است. نتایج بررسی ها حاکی از آنند که هر سال سویه MRSA در سرتا سر جهان افزایش می یابد (۲). طبق آمار در آمریکا عفونت های نازوفارنژ ایجاد شده توسط MRSA از ۱۴/۳ در سال ۱۹۸۷ به ۳۹/۷ در سال ۱۹۹۷ افزایش پیدا کرده است (۳). یک بررسی دیگر در همین کشور افزایش MRSA را در بیمارستانها از ۲۴ در سال ۱۹۷۴ به ۵۰ در سال ۱۹۹۷ نشان می دهد (۴). بررسی ها در سایر نقاط جهان نیز نشان از افزایش سال به سال این سویه دارند. برای مثال در تحقیقی که در سال ۲۰۰۱ در کانادا صورت گرفت از ۳۰۹ ایزوله بالینی، ۲۱۳ مورد سویه MRSA (۶۸/۹) و بقیه سویه استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین (Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus=MSSA) تشخیص داده شدند (۵). در انگلستان در سال ۱۹۹۹ با روش PCR، ۴۴ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند که ۲۱ مورد ژن مقاومت به متی سیلین را نشان دادند (۶). بررسی ها در هنگ کنگ و استرالیا نیز روند مشابهی را نشان دادند (۷، ۲).

سویه MRSA دارای ژن مقاوت به متی سیلین (ژن mec-A) است. این ژن پروتئینی به نام PBP2a (پروتئین های باند شونده به پنی سیلین) را کد می نماید که میل ترکیبی آن در اتصال به متی سیلین کمتر از سایر پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین در دیواره

باکتری می باشد. در باکتری حساس (فاقد ژن mec-A)، متی سیلین با میل ترکیبی بیشتری به پروتئین PBP در دیواره سلول متصل می شود که سبب لیز دیواره سلول باکتری و سرانجام مرگ آن می گردد. سویه های که دارای این ژن هستند به بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر هم مقاومت نشان می دهند (مقاومت چند دارویی) که علاوه بر ایجاد مشکلات در درمان بیماری، سبب کلونیزاسیون و انتشار در محیط بیمارستان، انتشار به سایر بیماران می گردند (۲).

به دلیل بیان غیر یکنواخت ژن mec-A، تست های تشخیصی و سنجش حساسیت ضد میکروبی معمولی در تشخیص دقیق باکتری و مقاومت به متی سیلین ناتوانند. لذا لازم است جهت تشخیص دقیق و کنترل بیماری از روشهای دقیق، سریع و اختصاصی تر همانند PCR استفاده شود که بر اساس تکثیر ژن mec-A عمل می کند (۸). این ژن در سویه MSSA وجود نداشته، و وجود آن در استافیلوکوک اورئوس نشانه مقاومت به متی سیلین (۹) است. بنابر این هدف این مطالعه شناسائی و تعیین فراوانی سویه های مقاوم و حساس به متی سیلین در ایزوله های بالینی جدا شده از بیمارستانهای همدان بود.

**روش کار:**

این پژوهش از نوع توصیفی در سال ۱۳۸۴ بر روی ۷۰ ایزوله استافیلوکوک اورئوس که از مراکز درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان و یک آزمایشگاه خصوصی بدست آمده بودند، انجام گرفت. ایزوله های که تستهای گرم، کاتالاز، مانیتول، کواگولاز و DNase آنها مثبت بودند بعنوان استافیلوکوک اورئوس در نظر گرفته شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی نیز بر روی محیط مولر هینتون آگار فاقد نمک انجام شد. بدینصورت که از باکتری رشد کرده بر روی محیط بلاد آگار (به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷° C) جهت تهیه سوسپانسیون برابر با ۰/۵ مک فارلند استفاده و بوسیله سواب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس آنتی بیوگرام هر سویه برای ۱۲ عدد دیسک آنتی بیوتیک (پادتن طب) شامل دیسک های سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۱۲/۵ میکروگرم)، ریفاپین (۳۰ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)،

جدول ۱: نتایج آنتی بیوگرام ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مطالعه شده (۷۰ مورد) با روش دیسک آگار دیفیوژن

دیسک											
OXA	CP	E	TE	GM	STX	V	CF	CZ	CX	RA	P
۲۲	۱۴	۲۸	۳۲	۱۰	۲۸	-	۱۲	۱۴	۳۲	۴	۷۰
۴۸	۵۶	۴۰	۲۸	۵۴	۴۲	۶۸	۵۲	۵۱	۳۵	۶۵	-
-	-	۲	-	۶	-	۲	۶	۵	۳	۱	-

اریترومایسین = E سیپروفلوکساسین = CP اگزاسیلین = OXA  
 کوتریموکسازول = STX جنتامایسین = GM تتراسایکلین = TE  
 سفنازیدیم = CZ سفالوتین = CF وانکومایسین = V  
 پنی سیلین = P ریفامپین = RA کلوزایسلین = CX

بیشترین حساسیت ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مطالعه شده به شرح زیر بود:

- ۱- وانکومایسین ۶۸ مورد (۹۷/۱٪) - ۲- ریفامپین ۶۵ مورد (۹۲/۸٪) - ۳- سیپروفلوکساسین ۵۶ مورد (۸۰٪)
- ۴- جنتامایسین ۵۴ مورد (۷۷/۱٪) - ۵- سفالوتین ۵۲ مورد (۷۴/۲٪) - ۶- سفنازیدیم ۵۱ مورد (۷۲/۸٪)

تمام سویه ها اعم از MRSA و MSSA مقاومت کامل را به دیسک پنی سیلین ۱۰ واحدی نشان دادند (جدول ۳ و ۲).

جدول ۲: نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های MRSA

دیسک											
OXA	CP	GM	E	TE	SXT	RA	P	CF	CZ	CX	
۲۲	۱۴	۱۵	۲۴	۲۶	۲۴	۴	۳۵	۱۶	۱۸	۳۲	مقاوم
۳۱/۴	۴۰	۴۲/۸	۶۸/۵	۷۴/۲	۶۸/۵	۱۱/۴	۱۰۰	۵۴/۷	۵۱/۴	۹۱/۴	درصد

بیشترین مقاومت سویه های MRSA به آنتی بیوتیک های زیر بود:

- ۱- پنی سیلین ۳۵ مورد (۱۰۰٪) - ۲- کلوزایسلین ۳۲ مورد (۸۸/۶٪) - ۳- تتراسایکلین ۲۶ مورد (۷۴/۲٪)
- ۴- اریترومایسین ۲۴ مورد (۶۸/۵٪) - ۵- کوتریموکسازول ۲۴ مورد (۶۸/۵٪) - ۶- سفنازیدیم ۱۸ مورد (۵۱/۴٪) و کمترین مقاومت به ریفامپین ۱۱/۴ بود

جدول ۳: نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های MSSA

دیسک											
OXA	CP	GM	E	TE	SXT	RA	V	P	CF	CZ	CX
۳۵	۳۵	۳۴	۲۹	۲۹	۳۱	۳۵	۳۵	.	۳۴	۳۴	۳۵
۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۱	۸۲/۵	۸۲/۸	۸۸/۵	۱۰۰	۱۰۰	.	۹۷/۱	۹۷/۱	۱۰۰

طبق نتایج مطالعه تمام سویه های حساس به متی سیلین (MSSA) حساسیت خیلی بالایی نسبت به پانسل آنتی بیوتیکی نشان می دادند.

سفالوتین (۳۰ میکروگرم) و کلوزایسلین (۵ میکروگرم) انجام شدند. سپس همه پلیت ها در دمای C ۳۵° به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه، و نتایج بر اساس جدول شرکت سازنده آنتی بیوتیک تفسیر گردیدند (۲).

استخراج DNA: برای این منظور از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن استفاده گردید.

آزمایش PCR جهت ردیابی ژن mec-A: از این تکنیک بعنوان روش استاندارد طلائی در ردیابی ژن mec-A در DNA استخراج شده از نمونه ها استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن mec-A شامل یک جفت پرایمر اختصاصی هر کدام (۲۲ bp) به صورت زیر بود که از شرکت سیناژن تهیه شد.

Forward primer  
 (1282) 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'  
 Reverse primer  
 (1787) 5'-AGT TCT GGA GTA CCG GAT TTG C -3'  
 طول قطعه حاصل از فعالیت این پرایمر ها ۵۳۳bp بود.

واکنش PCR شامل ۲μL 10x buffer، 10mM dNTP، 2.4μL 2μL 50mM MgCl<sub>2</sub>، پرایمرها از هر کدام 1μL 10mM Taq polymerase 2μL (0.5unit)، DNA Template 1μL، آب مقطر دیونیزه 8.6μL، حجم نهایی مجموعاً 20μL شد.

سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR شامل ۳۵ سیکل، ۶۰ ثانیه در ۹۵°C (denaturation)، ۳۰ ثانیه در ۵۰°C جهت اتصال پرایمر (annealing)، ۹۰ ثانیه در ۷۲°C برای تکثیر قطعه هدف (extension) بود. پس از انجام آزمایش PCR، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز، و در دستگاه ترانس لومیناتور تحت نور UV بررسی گردید (۱۰).

## نتایج:

در الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۷۰ نمونه جدا شده به روش دیسک آگار دیفیوژن (Disk Diffusion Agar = DDA) فقط ۲۲ مورد (۳۱/۴٪) مقاومت به دیسک متی سیلین / اگزاسیلین را نشان دادند. در صورتی که در آزمایش PCR علاوه بر این ۲۲ مورد، ۱۳ مورد که در روش DDA حساسیت به اگزاسیلین را نشان می دادند دارای ژن mec-A بودند (جدول ۱). بنابراین ایزوله هایی که در PCR دارای ژن mec-A بودن بعنوان سویه MRSA و آنهایی که فاقد ژن مذکور بودند سویه MSSA شناخته شدند.

مشکل می گردد. آمارها نشان می دهند که سویه های MRSA مقاوم به وانکومايسين در حال افزایش هستند (۱۲). مطالعات مشابه در شیراز نیز نشان داده است که میزان MRSA از ۳۳٪ در سال ۲۰۰۰ به ۴۳٪ در سال ۲۰۰۴ رسیده است (۱۳، ۱۴).

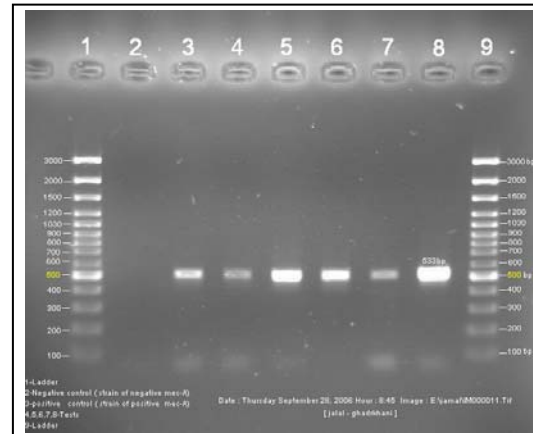
همانطور که در مطالعات مشابه ای که در بالا و مقدمه اشاره شد. شاهد افزایش سال به سال این سویه ها هستیم که علاوه بر اینکه یک چالش جدی برای پزشکان و مدیریت کنترل کننده عفونت ها بیمارستانی می باشند در کشور های که شاخص های بهداشتی و مراقبتی پایین دارند انتظار داریم با درصد افزایش یابنده ای از سویه های MRSA در سطح جامعه و به خصوص بیمارستان مواجه شویم. از طرفی شیوع واقعی سویه های MRSA وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی دارد بنابراین عاقلانه است که به دلیل تغییر الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوک اورئوس بررسی های دوره ای این تغییرات هر ۳ تا ۴ سال یکبار انجام گیرد (۱۴، ۱۵).

### نتیجه نهایی:

نتایج این پژوهش نشان داد که بروز MRSA در مراکز درمانی همدان به سطح ۵۰ درصد رسیده است و ما باور داریم که در حال حاضر یک فرصت مداخله موثر در محدود کردن شیوع MRSA در سطح مراکز بهداشتی و جامعه وجود دارد اما به طور قطع این فرصت در آینده وجود نخواهد داشت.

### منابع:

1. Shehab el-din SA, El-shfey Ell, El-hadiy MR, El-dlin AB, El-hadiy MM, Zaghlul HA. Methicillin resistant staphylococcus aureus, a problem in the burns unit. Egypt. J. Plast. Reconstr Surg 2003; 27(1):1-10
2. 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.
3. Sakoulas G, Cold HS, Vencataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant staphylococcus aureus comparison of susceptibility testing methods and analysis of mec-A positive susceptible strains: J Clin Microbiol 2001; 39(11): 3946-3951.
4. Jenison R, Heaberil A, Yang S, Polisky B, Ostrosf R. Thin film bio sensor for rapid



تصویر ۱: الکتروفورز انجام شده بر روی محصولات PCR در ژل آگارز ۱:

- چاهکهای ۱ و ۹ مارکر وزن ملکولی (100-3000bp)
- چاهک ۲ سوش کنترل منفی، فاقد ژن *mec-A* [MSSA ATCC 25923]
- چاهک ۳ سوش کنترل مثبت، دارای ژن *mec-A* [MRSA ATCC 43300]
- چاهکهای ۷، ۶، ۵، ۴ و ۸ نمونه های مثبت دارای ژن *mec-A* 533 bp

### بحث:

یافته های این مطالعه نشان دادند که استفاده از روشهای دقیق و حساس همانند PCR در شناسایی سویه MRSA در آزمایشگاه بعنوان روش روتین می تواند در تشخیص صحیح آنها از MSSA کمک شایانی کرده و در اتخاذ آنتی بیوتیکهای موثر مفید باشد. در غیر اینصورت استفاده از آنتی بیوتیکهای غیر ضروری در درمان سویه حساس MSSA باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی خواهد شد. لذا کاهش حساسیت این سویه ها به آنتی بیوتیک های همانند سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترو مایسین، سفالوتین و سفنازیدیم شاید به این دلیل باشد که در همدان از این آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های ناشی از این سویه ها و سایر عفونت های ایجاد شده توسط باکتریهای دیگر زیاد استفاده می شود (۱۱). بعلاوه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی حاکی از آن است که سویه های MRSA نسبت به سویه های MSSA مقاومت چند دارویی را نشان می دهند. نظر به اینکه سویه های MRSA تنها به آنتی بیوتیک وانکومايسين حساسیت دارند مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک در درمان مبتلایان به عفونت ناشی از MRSA می تواند عواقب خطرناکی را به دنبال داشته باشد که شامل افزایش آنتروکوک های مقاوم به وانکومايسين و بالاتر از آن خطر ایجاد سویه های MRSA مقاوم به وانکو مایسین است که در چنین مواردی درمان بیمار واقعاً

- detection of mec-A from methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Clin Chem* 2000; 46(9):1501-1504
5. Arbique J, Forward K, Haldane D, Davidson S Comparison of the Velogene Rapid MRSA Identification Assay, Denka MRSA-Screen Assay, and BBL Crystal MRSA ID System for rapid identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Diag Microbial Infect Dis* 2001; 40(1-2):5-10.
  6. Leibovici L, Soares-Weiser K, Paul M, Goldberg E, Herxheimer A, Garner P. Considering resistance in systemic reviews of antibiotic treatment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4): 564-571
  7. Ho PI, Tse CWS, Mak GC, Chow KH, Ng TK. Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(4): 845-846.
  8. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *PNAS* 2002;99(11): 7687-7692
  9. Hallin M, Maes N, Byl B, Jacobs F, De Gheldre Y, Struelens MJ. Clinical Impact of a PCR Assay for Identification of Staphylococcus aureus and Determination of Methicillin Resistance Directly from Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3942-3944
  10. Zamani AR, Tavakkol Afshari J, Alikhani MY. Molecular cloning and expression of human gamma interferon full cDNA in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. *Iranian J Immunol* 2006,3(1): 1-7
  11. Harbarth S, Martin Y, Rohner P, Henry N, Auckenthaler R, Pittet D. Effect of delayed infection control measures on a hospital outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J Hosp Infect* 2000; 46(1): 43-49.
  12. Naimi TS, Anderson D, Carol B, Boxrud DJ, Johnson SK, Tenover FC, et al. Vancomycin-intermediate staphylococcus aureus with phenotypic susceptibility to methicillin in a patient with recurrent bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003;36(12):1609-1612
  13. Alborzi A, Pourabbas BA, Salehi H, Pourabbas BH, Obiidi B, Panjehshahin MR. Prevalence and pattern of antibiotic sensitivity of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Shiraz. *Iranian J Med Sci* 2000;25(1,2): 1-8.
  14. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modification DNA extraction for rapid PCR detection of Methicillin-resistant Staphylococci. *Iranian Biomed J* 2004;8(3): 161-165
  15. Muller AA, Maumy F, Bertin M, Gorntte C, Lopez-Lopezlozano JM, Viel JF, et al. Relationship between spread of methicillin-resistant staphylococcus aureus and antimicrobial use in a French university hospital. *Clin Infect Dis* 2003; 36(8): 971-978.