الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی ژن mecA در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا سازی شده از بیمارستان های شهر تهران در طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۷

فاتح رحیمی[۱]، محمد رضا پورشفیع[۲]، مجید بوذری [۳]*، محمد کتولی[۴]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲. میکروب شناس، استاد بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۳. ویروس شناس، دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۴. میکروب شناس، استاد دانشکده بهداشت و علوم ورزشی، دانشگاه سان شاین کوست، استرالیا

* نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزارجریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
mbouzari@yahoo.com
دریافت مقاله: اسفند نود پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری زای انسانی و دامی است که واجد طیف وسیعی از فاکتورهای ویرولانس می باشد. عفونت های ناشی از استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین (MRSA) به یکی از معضلات بزرگ در درمان آنتی بیوتیکی مبدل گردیده است. این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه های بالینی در آزمایشگاه های شش بیمارستان در شهر تهران در طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۷ به انجام رسیده است.*

روش کار: *در این مطالعه در مجموع ۳۹۶ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از شش بیمارستان در شهر تهران مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. تمامی سویه ها با استفاده از پرایمر اختصاصی و آزمون های بیوشیمیایی تا حد گونه شناسایی شدند. حساسیت سویه ها نسبت به ۱۸ آنتی بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و هم چنین MIC اگزاسیلین و ونکومایسین آنها به روش Etest و با استفاده از توصیه های CLSI تعیین گردید. جهت تعیین وجود ژن mecA از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید.*

یافته ها: *تمامی ۳۹۶ ایزوله مورد نظر به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند. بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های اگزاسیلین، پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، کانامایسین، اریترومایسین، توبرامایسین و آمیکاسین مشاهده گردید. ۸۶ درصد از سویه ها از مقاومت بالایی نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند (MIC≥256 µg/ml). هیچ کدام از سویه ها نسبت به ونکومایسین مقاوم نبودند. ۱۰۰ درصد سویه های واجد ژن mecA بودند.*

نتیجه گیری: *شیوع سویه های MRSA در شهر تهران در این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات پایین تر است. آنتی بیوتیک های ونکومایسین، لینزولید، سینرسید و کلرامفنیکل می توانند بهترین انتخاب جهت درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA باشند. شناسائی ژن mecA یک روش اختصاصی و سریع برای شناسائی سویه های MRSA است.*

واژگان کلیدی: *MRSA، متی سیلین، ونکومایسین، mecA، تهران*

مقدمه

جنس استافیلوکوکوس متشکل از باکتری های گرم مثبتی است که در پوست و غشاءهای مخاطی انسان و حیوانات یافت می شود. در میان گونه های مختلف استافیلوکوکوس، استافیلوکوکوس اورئوس مهاجم ترین گونه است و به عنوان عامل اتیولوژیک بیماری های مختلفی در انسان و حیوانات مانند عفونت پوست، آبسه ها، مسمومیت غذایی، سندرم شوک سمی، سپتی سمی، اندوکاردیت و پنومونی شناخته می شود(۱و۲). استافیلوکوکوس اورئوس یکی از برجسته ترین و مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های باکتریایی اکتسابی از بیمارستان و جامعه در سطح جهان می باشد(۳). ناهم گونی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تا حدودی در نتیجه برهم کنش با میزبان های پستاندار ایجاد می شوند. عوامل حدت مسلم و احتمالی مختلف، ژن های مسئول انطباق و سازگاری با میزبان و هم چنین سموم بر روی عناصر ژنتیکی متحرکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون ها، باکتریوفاژها، جزایر بیماری زایی و کاست های کروموزومی استافیلوکوکوس اورئوس قرار گرفته اند(۷-۴).

برای غلبه بر عفونت های ناشی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین، یک پنی سیلین نیمه صناعی با طیف محدود (متی سیلین) معرفی گردید. اما به سرعت در سال ۱۹۶۱، نخستین جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی گردید. ابتدا مواجهه با جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تنها در بیمارستان ها بود، اما در اواخر دهه ۱۹۹۰ نخستین کلون های حاد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه که مشخصه بارز آنها وجود سم لوکوسیدین پنتون ولنتاین بود، شناسایی و با سرعت غیرقابل باوری گسترش پیدا کرد(۸) و به سرعت در سراسر جهان، ابتدا تنها در جوامع و بعدها در بیمارستان ها و مراکز درمانی، گسترش یافت و حتی جایگزین جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان شد. به همین دلیل، امروزه افتراق میان جدایه های Community Acquired-MRSA (CA-MRSA) و بیشتر سویه های Hospital Acquired-MRSA (HA-MRSA) واجد مقاومت چند آتی بیوتیکی به یک چالش بزرگ تبدیل شده است(۹و۱۰).

مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین، ناشی از حضور ژن mecA است که رمز کننده یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین ۷۸ کیلو دالتونی (PBP2a یا 'PBP2) می باشد. در مقایسه با سایر پروتئین های باند شونده به پنی سیلین PBP2a از میل ترکیبی پایینی نسبت به تمامی آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام برخوردار است. بنابراین، حتی در حضور آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام، بیوسنتز لایه پپتیدوگلایکان متوقف نشده و باکتری می تواند به حیات خود ادامه دهد(۹). اپرون mec توسط مجموعه کروموزومی mec استافیلوکوکی (SCCmec) حمل می شود. خاست گاه و منشاء ژن mec نامشخص است، اما پیشنها شده است که احتمالا از استافیلوکوکوس سیوری به استافیلوکوکوس اورئوس منتقل شده باشد؛ و استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی واجد ژن mecA مانند استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس مخازن بالقوه عناصر SCCmec به شمار می روند(۱۱). دسته بندی SCCmec که عناصر SCCmec را بر اساس اختلافات ساختمانی آنها دسته بندی می نماید نیز امروزه به طور گسترده ای در مطالعات همه گیرشناسی برای افتراق سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و یا برای مشخص نمودن یک کلون استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در ترکیب با ژنوتایپ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین که در آن یک عنصر SCCmec الحاق شده است، مورد استفاده قرار می گیرد(۱۲). این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و هم چنین تعیین ژن mecA در میان سویه های MRSA به دست آمده در طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۷ از شش آزمایشگاه بیمارستان در شهر تهران به انجام رسیده است.

روش کار

جهت انجام این مطالعه، در طی سال های ۱۳۹۰-۱۳۸۷ در مجموع ۹۱۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از شش آزمایشگاه بیمارستان در شهر تهران(۵ بیمارستان دانشگاهی و یک بیمارستان خصوصی) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ۱۵۱ ایزوله از بیمارستان A، ۱۰۹ ایزوله از بیمارستان B، ۱۸۹ ایزوله از بیمارستان C، ۱۳۲ ایزوله از بیمارستان D، ۶۰ ایزوله از بیمارستان E و ۲۷۳ ایزوله از بیمارستان F به دست آمد.

تمامی ایزوله ها در آزمایشگاه های بیمارستان های مذکور تحت عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسائی قرار گرفته بودند با این حال در آزمایشگاه بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران تمامی ایزوله ها در ابتدا با استفاده از آزمون های رنگ آمیزی گرم، کواگولاز و DNase و تخمیر قند مانیتول مجددا مورد بررسی و تأیید قرار گرفت(۱۳).

پس از شناسائی اولیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۱ میکروگرم) (MAST Group, Merseyside, United Kingdom)، به روش دیسک دیفیوژن و با استفاده از استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین گردید(۱۴). سپس حداقل غلظت مهار کنندگی آنتی بیوتیک اگزاسیلین و ونکومایسین سویه های مقاوم به روش Etest با استفاده از استانداردهای CLSI و دستورالعمل های شرکت سازنده (AB, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) مشخص گردید(۱۵). سرانجام سویه های مقاوم به اگزاسیلین انتخاب گردیدند و با استفاده از ۱۷ آنتی بیوتیک تترایسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۲۰ میکروگرم) کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، فوزیدیک اسید (۱۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم)، ریفامپی سین (۲ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۵۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سولفامتوکسازول-تری متوپریم (۱/۲۵ و ۲۳/۷۵ میکروگرم)، لینزولید (۱۰ میکروگرم) و سینرسید (۱۵ میکروگرم) الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها مشخص گردید(۱۴). در انجام آزمون های تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از دو سویه استاندارد S. aureus ATCC 25923, S. aureus ATCC 29213 بعنوان شاخص های مقاومت و حساسیت به اگزاسیلین استفاده گردید.

جهت استخراج DNA برای انجام آزمون های مولکولی، کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) با استفاده از دستورالعمل های شرکت سازنده و با اندکی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت.

پس از شناسائی اولیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی، تمامی سویه های مقاوم به اگزاسیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با توالی NUC-f: AGTTCAGCAAATGCATCACA و NUC-r: TAGCCAAGCCTTGACGAACT مورد بررسی قرار گرفت(۱۶). جهت انجام PCR از برنامه های حرارتی 94°C (5 min), 30 cycles [94°C (45 s), 62°C (45 s), 72°C (1 min and 45 s)], 72°C for 8 min در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) استفاده شد. جهت تعیین وجود ژن مقاومت mecA از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر استفاده گردید (۱۷).

mecA1: GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA
mecA2: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA

برنامه حرارتی برای این واکنش شامل 94°C (5 min), 30 cycles [94°C (15 s), 61°C (15 s), 72°C (30 s)], 72°C for 5 min. بود.

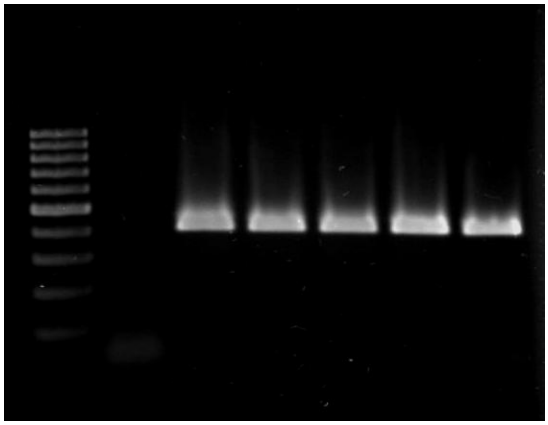
واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت و هر میکروتیوب متشکل از ترکیب زیر بود:

10X PCR buffer, taq DNA polymerase (0.5 U) (HT Biotechnology, Cambridge, United Kingdom), each primer (1.6 µM), MgCl2 (1.2 µM) and each dNTP (0.64 µM)

سپس محصولات در یک ژل آگارز ۱٪ و همچنین Tris-borate-۰/۵ X EDTA (TBE) buffer الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم برماید با استفاده از دستگاه Gel Ducumentation مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون های فنوتیپی جهت شناسائی اولیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تمامی ۹۱۴ ایزوله مورد تأیید قرار گرفتند. سپس با انجام آزمون دیسک دیفیوژن جهت غربال گری سویه های مقاوم به متی سیلین، ۳۹۶ سویه (۴۳/۳ درصد) به عنوان سویه های MRSA جهت انجام بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه صحت شناسائی ۳۹۶ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس را مورد تأیید قرار داد(تصویر ۱).



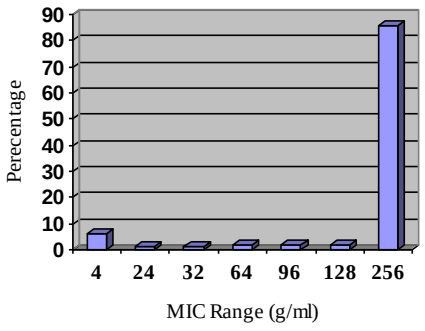
تصویر ۱. محصول PCR ژن nuc (۴۰۰ bp) در سویه های MRSA. شماره ۴-۱: سویه های MRSA مورد بررسی در این مطالعه. شماره ۵: سویه S. aureus ATCC 29213 (کنترل مثبت). شماره ۶: کنترل منفی(None Template Control). ۷: مارکر وزن مولکولی.

پس از شناسایی سویه ها، مقاومت آنتی بیوتیکی هر یک از این سویه ها نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک عنوان شده در بخش مواد و روش ها مورد بررسی قرار گرفت. در جدول ۱ میزان و درصد مقاومت این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف نشان داده شده است. تمامی سویه های MRSA نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاوم بودند. همچنین بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، کانامایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، آمیکاسین و تتراسایکلین مشاهده شد. دو آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین و فوزیدیک اسید از تأثیر بالایی بر روی سویه های MRSA برخوردار بودند و تنها در حدود ۲ درصد از سویه ها نسبت به این دو آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند. هیچ یک از سویه های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های سینرسید، لینزولاید و کلرامفنیکل مقاوم نبودند. در مجموع ۸ درصد سویه نسبت به تمامی آنتی بیوتیک ها، به استثناء پنی سیلین، حساس بودند و تنها ۳ درصد سویه MRSA نسبت به تمامی آنتی بیوتیک ها به استثناء سه آنتی بیوتیک، کلرامفنیکل، لینزولید و سینرسید مقاوم بودند.

جدول شماره ۱. فراوانی و درصد مقاومت سویه های S. aureus نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف

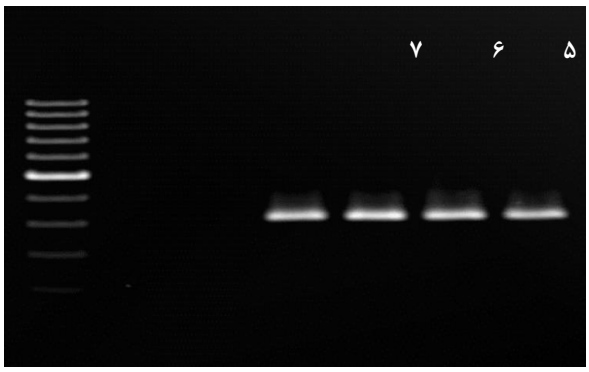
آنتی بیوتیک	فراوانی	درصد
اگزاسیلین	۳۹۶	۱۰۰
پنی سیلین	۳۹۶	۱۰۰
کلیندامایسین	۳۰۵	۷۷
توبرامایسین	۳۴۰	۸۶
تتراسایکلین	۳۱۲	۷۹
نیتروفورانتوئین	۸	۲
فوزیدیک اسید	۶	۱/۵
کانامایسین	۳۶۰	۹۱
آمیکاسین	۳۱۷	۸۰
اریترومایسین	۳۵۶	۹۰
سیپروفلوکساسین	۳۶۴	۹۲
SXT	۲۳۶	۶۰
ریفامپین	۲۳۰	۵۸
جنتامایسین	۲۰۰	۵۱
مینوسایکلین	۲۱۰	۵۳
سینرسید	۰	۰
لینزولید	۰	۰
کلرامفنیکل	۰	۰

پس از تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، ۳۹۶ سویه ای که نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین مقاوم بودند انتخاب و MIC آنها به روش Etest تعیین گردید(نمودار ۱). سویه هایی که MIC آنها برابر یا بیش از ۴ میکروگرم در میلی لیتر بود، جهت بررسی های بیشتر انتخاب گردیدند. پس از انجام آزمون MIC معین گردید که از مجموع ۳۹۶ سویه مقاوم؛ ۳۴۰ سویه (۸۶ درصد) دارای مقاومت بالایی نسبت به متی سیلین بودند(MIC برابر یا بیش از ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) و ۲۵ سویه (۶ درصد) نیز از مقاومت معمول نسبت به متی سیلین برخوردار بودند (MIC بین ۲۴ تا ۹۶ میکروگرم در میلی لیتر). هم چنین ۶ درصد سویه ها نیز حداقل مقاومت نسبت به متی سیلین(MIC برابر ۴ میکروگرم در میلی لیتر) را نشان دادند. نتایج حاصل از آزمون Etest در مورد آنتی بیوتیک ونکومایسین نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه های MRSA نسبت به ونکومایسین حساس بودند و هیچ کدام از سویه ها از مقاومت حد واسط نیز برخوردار نبودند.



نمودار ۱. میزان MIC اگزاسیلین در میان سویه های MRSA

نمودار ۱. میزان MIC اگزاسیلین در میان سویه های MRSA جهت انجام آزمون PCR برای شناسایی ژن مقاومت mecA از DNA استخراج شده با روش کیت استفاده گردید. بنابراین پس از بهینه سازی و انجام روش PCR بر روی سویه های فوق، محصول PCR ژن mecA با وزن ملکولی ۳۱۰ جفت باز حاصل گردید(تصویر ۲) و نتایج نشان داد که تمامی سویه های MRSA واجد ژن mecA بودند.



تصویر ۲. محصول PCR ژن mecA (۳۱۰ bp) در سویه هایMRSA . شماره ۳-۱: سویه های MRSA مورد بررسی در این مطالعه. شماره ۴: سویه S. aureus ATCC 29213 (کنترل مثبت). شماره ۵: S. aureus ATCC 25923 (کنترل منفی). شماره ۶: کنترل منفی (None Template Control). ۷: مارکر وزن مولکولی.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان فراوانی سویه های MRSA در میان بیمارستان های منتخب شهر تهران ۴۳/۳ درصد بوده است. در مورد فراوانی سویه های MRSA در ایران و به خصوص در شهر تهران آمار متفاوتی تا کنون گزارش شده است. در سال ۱۳۸۳ وحدانی و همکاران، فراوانی سویه های MRSA را بیماران بستری در ICU، ۹۰ درصد گزارش نمودند(۱۸). هم چنین امین زاده و شجری نیز در دو مطالعه مختلف میزان مقاومت را به ترتیب ۹۵ و ۹۶ درصد گزارش نموده اند(۱۹و۲۰). در شیراز، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، میزان شیوع سویه های MRSA را ۳۸ درصد گزارش نموده است(۲۱). در مطالعه رحیمی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۶، ۸۸ درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس را سویه های MRSA تشکیل داده بودند(۲۲). در سال ۱۳۸۹، جوان و همکاران فراوانی سویه های MRSA را در چندین بیمارستان دولتی در شهر تهران، ۴۵ درصد گزارش نمودند(۱۳). بنابراین به نظر می رسد که در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته در تهران و سایر شهرها، کم ترین فراوانی سویه های MRSA متعلق به این مطالعه باشد. شاید بتوان یکی از دلایل پایین بودن فراوانی سویه های MRSA در این مطالعه را ناشی از استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی استاندارد خارجی و همچنین تعیین MIC سویه ها با استفاده از Etest دانست. همچنین، دلیل دیگر این امر می تواند ناشی از تعداد بالای نمونه های به دست آمده از یک بیمارستان (بیمارستان F) و هم چنین تعداد بیشتر نمونه های مربوط به بیماران سرپائی در این بیمارستان باشد.

در سایر کشورها نیز آمار مختلفی از فراوانی این سویه های تا کنون گزارش شده است. این میزان مقاومت در آمریکا در طی روندی افزایش ی از ۲/۱٪ در سال ۱۹۷۵ به ۶۰٪ در سال ۲۰۰۴ رسیده است. در حال حاضر نیز این میزان در پاره ای از موارد تا ۷۰٪ افزایش یافته است(۲۴و۲۵). فراوانی این سویه ها در هلند و سوئد کمتر از ۱ درصد تا ۵۴ درصد در پرتغال متفاوت گزارش شده است(۲۶). این میزان در استرالیا در حدود ۲۳/۶٪ و در ژاپن در حدود ۷۰٪ گزارش گردید(۲۶). در مطالعه Archer نیز میزان مقاومت ۳۸٪ بود(۲۷). متفاوت بودن آمارهای ارائه شده از کشورها و حتی شهرهای مختلف را می توان ناشی از الگوهای درمانی و آنتی بیوتیکی مختلف در کشورهای مختلف در طی سالیان متعدد، هم چنین استفاده از روش های مختلف و در پاره ای از موارد غیر استاندارد جهت بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی و به علاوه انجام آزمایشات در تعداد محدودی از بیمارستان ها و مراکز درمانی در آن شهرها دانست.

نتایج حاصل از بررسی مقاومت سویه های MRSA نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین نشان داد که بر خلاف سایر مطالعات انجام شده در ایران، تمامی سویه ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند. از لحاظ مقاومت به ونکومایسین باید خاطر نشان ساخت که، نخستین سویه مقاوم به ونکومایسین در سال ۱۹۹۷ در ژاپن گزارش گردید VRSA (Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus) و پس از آن در کشورهای انگلستان، فرانسه و ایالات متحده گزارشاتی از شیوع سویه های VRSA مشاهده شد(۲۸). در مطالعات مختلفی نیز که تاکنون در ایران انجام گرفته؛ گزارشات متفاوتی از شیوع سویه های استافیلوکک مقاوم به ونکومایسین مشاهده شده است. در مطالعه شجری و همکاران در سال ۱۳۸۱ میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین در حدود ۱۸/۴٪ گزارش شده است(۲۰). میزان مقاومت به ونکومایسین در برخی از مطالعات در ایران صفر درصد گزارش شده است(۱۹و۲۲و۲۳و۲۹). ستاری نیز میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین را در میان سویه های S. aureus ۳٪ گزارش نمود(۳۰). بنابراین با توجه به اطلاعات بدست آمده از تمامی مطالعات انجام گرفته در ایران و مقایسه با سایر کشورهای جهان می توان گفت که، با توجه به پایین بودن میزان مقاومت به ونکومایسین در میان سویه های S. aureus در سراسر جهان، میزان مقاومت ارائه شده از برخی از مطالعات در ایران نمی تواند قابل استناد باشد و این امر را می توان به استفاده از روش های نامناسب جهت تعیین مقاومت نسبت به ونکومایسین مانند دیسک دیفیوژن و هم چنین عدم ارائه آنالیزهای ژنتیکی نسبت داد. باید توجه داشت که بر اساس استانداردها و دستورالعمل های ارائه شده از طرف CLSI، جهت تعیین مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ونکومایسین باید از روش های غربالگری آگار و تعیین MIC بر اساس روش های Etest و یا دایلوشن (ماکرو و یا میکرو) استفاده نمود. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که سه آنتی بیوتیک لینزولید، سینرسید و کلرامفنیکل می توانند موثرترین آنتی بیوتیک ها جهت درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA در ایران باشد. اما شاید بتوان گفت که این امر می تواند ناشی از پایین بودن میزان استفاده از این آنتی بیوتیک باشد و تقریبا استفاده از این آنتی بیوتیک بدست فراموشی سپرده شده است. اما با این وجود این آنتی بیوتیک همچنان به عنوان یکی از انتخاب های اصلی جهت درمان عفونت های ناشی از MRSA مورد توجه می باشد(۱۸). اما در مورد دو آنتی بیوتیک لینزولید و سینرسید بایستی عنوان داشت که این دو آنتی بیوتیک بسیار جدید هستند و به واسطه هزینه بالا استفاده از آنها در ایران چندان رایج نمی باشد، بنابراین مقاومتی نیز تا کنون نسبت به آنها گزارش نشده است. در مطالعه جوان و همکاران نیز هیچ کدام از سویه های MRSA نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم نبودند(۲۳).

در این مطالعه ۶۰ درصد از سویه ها مقاوم به سولفامتوکسازول-تری متوپریم بودند. در مطالعه وحدانی و همکاران در سال ۱۳۸۳ میزان مقاومت ۴۴٪ گزارش شده است(۱۸). رحیمی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۸ میزان مقاومت را ۴۱ درصد گزارش نمودند(۲۲). جوان نیز میزان مقاومت به SXT را در حدود ۷۸ درصد گزارش نمود(۲۳). با توجه به روند رو به رشد مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک در طی سال های مختلف به نظر می رسد که این آنتی بیوتیک نیز نمی تواند نامزد مناسبی برای درمان عفونت های ناشی از MRSA باشد.

میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، کانامایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، آمیکاسین و تتراسایکلین بیش از سایر آنتی بیوتیک های مورد استفاده در این مطالعه است و بنابراین می توان گفت که در استفاده های درمانی نمی توانند اثرات قابل ملاحظه ای داشته باشند. در ایران از آنتی بیوتیک های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین بطور گسترده ای استفاده می شود و همین امر می تواند دلیلی جهت افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها باشد. هم چنین مطالعات مختلف نشان می دهند که امکان انتقال پلاسمیدهای مقاومت به تتراسایکلین در میان بسیاری از گونه ها و جنس های مختلف باکتریای وجود دارد(۱۸)؛ هم چنین این مقاومت حتی از سویه های حیوانی نیز به سویه های انسانی قابل انتقال می باشد. این آنتی بیوتیک امروزه جهت مصارف دامی به عنوان یک افزودنی به غذای دام ها مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر ونکومایسین که پیش تر اشاره گردید، جنتامایسین نیز از جمله آنتی بیوتیک های مؤثر بر علیه MRSA می باشد. میزان مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک تا حدودی منطبق بر سایر مطالعات می باشد. در مورد کلینداماسین نیز باید اظهار داشت که به رغم اینکه متخصصان بسیاری در ایران هم چنان این آنتی بیوتیک را به صورت تجربی و پیش از مشخص شدن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و یا حساس به متی سیلین مورد استفاده قرار می دهند، اما نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین مطالعه دیگری که توسط جوان و همکاران به انجام رسیده است(۲۳) نشان دهنده روند فزاینده مقاومت سویه های MRSA نسبت به این آنتی بیوتیک است و بنابراین بایستی در استفاده از این آنتی بیوتیک تجدید نظر نمود. در نیجریه نیز میزان مقاومت نسبت به کلینداماسین در سال ۲۰۰۵، ۹۲ درصد گزارش شده است(۳۱).

حداقل غلظت مهار کنندگی سویه های MRSA در این مطالعه بسیار متنوع بود. اما در مجموع ۸۶ درصد از سویه ها از مقاومت بسیار بالایی نسبت به اگزاسیلین (MIC≥256 µg/ml) برخوردار بودند. در مورد میزان MIC اگزاسیلین سویه های MRSA گزارشات مختلفی در دست می باشد. رحیمی و همکاران، MIC اگزاسیلین ۵۷ درصد سویه ها را بیشتر از ۱۲۸ µg/ml گزارش نموده اند (۲۲). در مطالعه جوان و همکاران نیز ۹۵/۹ سویه ها از MIC≥256 µg/ml برخوردار بودند (۲۳). این آمار در کشورهای مختلف متفاوت بوده و از ۱۲۸-۵۱۲ µg/ml در ژاپن و سریلانکا، در سال های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ متفاوت بوده است(۳۲).

در این مطالعه تمامی سویه های MRSA واجد ژن mecA بودند، بنابراین مقاومت نسبت به متی سیلین در تمامی سویه ها ناشی از بیان ژن mecA است. در مطالعه جوان و همکاران، ۵ درصد از سویه های MRSA فاقد ژن mecA بودند و این پدیده را ناشی از جهش در ژن مقاومت به متی سیلین و هم چنین وجود تفاوت های فیزیولوژیکی در میان سویه ها دانسته اند(۲۳). همچنین رحیمی و همکاران نیز فراوانی ژن mecA را در میان سویه های MRSA، در حدود ۹۰ درصد گزارش نموده اند (۲۲).

نتیجه گیری

به نظر می رسد میزان شیوع سویه های MRSA در این مطالعه کمتر از سایر گزارشات در ایران باشد. شاید دلیل این امر رعایت کامل و دقیق استانداردهای ارائه شده از طرف CLSI و هم چنین استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی استاندارد باشد. به علاوه، در این مطالعه نمونه های به دست آمده از ۵ بیمارستان دانشگاهی و یک بیمارستان خصوصی در شهر تهران همگی نمونه های بیمارستانی نبوده و بیشتر آنها مربوط به نمونه های اکتسابی از اجتماع می باشند. شاید یکی از دلایل پائین بودن فراوانی سویه های MRSA در این مطالعه مربوط به این مطلب باشد.

با توجه به اینکه شیوع عفونت های بیمارستانی ناشی از MRSA نشان دهنده میزان کارایی اقدامات کنترل عفونت در بیمارستان ها می باشد و از طرفی لزوم درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها با ونکومایسین، موجب ظهور استافیلوکوکوس های مقاوم به ونکومایسین و هم چنین صرف هزینه های بالایی شده است، بنابراین ضروری بنظر می‌رسد که تحقیقات جامعی در نقاط مختلف کشور در این زمینه انجام پذیرد.

REFERENCES

1. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. J Clin Invest. 2009; 119: 2464–2474.

2. Van Belkum A. Staphylococcal colonization and infection: homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence. Curr Opin Infect Dis. 2006; 19: 339–344.

3. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 629–641.

4. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 2002; 359: 1819-1827.

5. Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J Bacteriol. 2008; 190: 300–310.

6. Diep B, Gill S, Chang R, Phan T, Chen J, Davidson M, et al. Perdreau-Remington. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. 2006; 367: 731–739.

7. Lindsay J, Holden M. Staphylococcus aureus: superbug, super genome? Trends Microbiol. 2004; 12: 378–385.

8. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Classification and Typing Methods: an Overview. Pol J Microbiol. 2011; 60: 95-103.

9. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Brug-geman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 222–235.

10. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat. Rev. Microbiol. 2009; 7: 629–641.

11. Wu SW, Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the mecA gene homologue of Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in Staphylococcus aureus. J Bacteriol. 2001; 183: 2417–2424.

12. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 4352–4359.

13. MacFadin JF. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Willialms and Wilkins.

14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement, vol. 21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2001.

15. National committee for clinical Laboratory standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. M7-A5. MIC testing. NCCLS.Villanova, Pa. 2000.

16. Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses Public Health. 2008; 55: 313–319.

17. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Screening Swabs, Nottingham, United Kingdom. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1821-23.

18. Vahdani P, Saifi M, Aslani MM, Asarian AA, Sharifi K. Antibiotic resistance patterns in MRSA isolated from patients admitted in ICU infectious ward. Tanaffos. 2004; 3: 37-44.

19. Aminzadeh Z, Mastari Farahani A, Gachkar L. Prevalence of Staphylococcus aureus careers in chronic hemodialysis patients referred to hemodialysis ward in Dr. Labbafinejad hospital and detection of antimicrobial resistance pattern. Iran J Infect Dis Tropic Medicine. 2004; 9(25): 23-28 (Full Text in Persian).

20. Shajari GR, Moniri R. Antibiotic susceptibility and resistance pattern of Staphylococcus aureus isolated from samples sent to central laboratory of Kashan. Feiz. 2002; 6(23): 31-36 (Full Text in Persian).

21. Japooni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (mecA) in Staphilococcus aureus isolated from clinical specimens. Iran Biomed J. 2004; 8: 173-178.

22. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among Staphylococcus spp. With emphasis on detection of mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Iran J Clin Infect Dis. 2009; 4: 143-150.

23. Javan E, Falahati HR, Saifi M, Talebi M, et al. Study of mecA gene among high level oxacillin resistance Staphylococcus aureus strains isolated from Tehran hospitals. Iran J Infect Dis Tropic Medicine. 2010; 15(49): 17-22 (Full Text in Persian).

24. Lin Y, Lauderdale T, Lin H, Chen P, Cheng M, et al. An outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in patients of pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers, Kaohsiung, Taiwan. J Microbial Immunol Infect. 2007; 40: 325-334.

25. Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2001; 48: 65-70.

26. Daniel L, Natalie C. Structural basis for the β-Lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus, British Columbia, Canada. Nature Structure bio. 2002; 9: 870-76.

27. Archer GLD, Niemeyer M, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequence associated with methicillin resistance. Antimicrob Agents Chemather. 1994; 38: 447-454.

28. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 327–32.

29. Mohammad Alizadeh A,Yadegari D, Rafizadeh R, Hosseini Moghadam M, Jahanbin M. Antibiogram pattern of gram positive microorganisms in Tehran. Iran J Infect Dis Tropic Medicine. 2005; 10(31): 47-52 (Full Text in Persian).

30. Zandi F, Sattari M. Identification and determination of antibiotic resistance pattern and beta-lactamase production within staphylococcus strains isolated from urinary tract infections. Iran J Infect Dis Tropic Medicine. 2005; 10(28): 23-36 (Full Text in Persian).

31. Zorgani A, Shawerf O, Tawil K, EI-Turki E, Ghenghesh KS. Inducible Clindamycin resistance among staphylococci isolated from burn patients, Tripoli, Libya. Libyan J Med. 2009; 4: 104-106.

32. Kato Y, Suzuki T, Ida T, Maebashi K, Sakurai M, et al. Microbiological and clinical study of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carrying VraS mutation: changes in susceptibility to glycopeptides and clinical significance, Tokyo, Japan. Inter J Antimicrob Agents. 2009; 31: 64–70.