

شناسایی و مقایسه ژن مقاومت متی سیلین *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی پیش و پس از عمل جراحی قلب باز بیمارستان شریعتی تهران و بیمارستان خصوصی دی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است که به واسطه وجود ژن *mecA* به بتالاکتام‌ها مقاوم می‌باشد. هدف مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی ژن مقاومت به متی‌سیلین در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بین بیماران پیش و پس از عمل جراحی قلب باز در بیمارستان‌های خصوصی دی و دولتی شریعتی تهران با استفاده از تکنیک PCR بوده است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی انجام و سپس آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعمل CLSI با آنتی‌بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید. جهت شناسایی ژن مقاومت از آزمون PCR و MPCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد فراوانی ژن *mecA* در نمونه‌های بالینی ۳۰٪ بوده و با مقایسه درصد فراوانی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA جدا شده در دو بیمارستان دی و شریعتی اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. در میان آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت پیش از انجام عمل جراحی قلب باز نسبت آنتی‌بیوتیک آگراسیلین ۹۵٪ و مقاومت آنتی‌بیوتیکی پس از عمل جراحی نسبت به آگراسیلین ۱۰۰٪، اریترومايسين و سفنازیدیم ۹۷٪ مشاهده شد که بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود.

نتیجه‌گیری: به دلیل اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای بیمارستانی و با توجه به کاهش معنی‌دار جداسازی سویه‌های MRSA پس از انجام جراحی قلب باز در بیمارستان خصوصی دی نسبت به بیمارستان شریعتی، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً شرایط محیطی و رعایت اصول استریلیزاسیون در بیمارستان خصوصی دی بیمارستان‌های دولتی به مراتب بهتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی‌بیوگرام، *mecA*، PCR

مرضیه السادات امینی^{۱*}، فرامرز سلیمانلو^۲، سجاد علیزاده^۱، هادی فیضی^۲، یاشار باقری زاده^۱، محمد موقرنژاد^۱، مهدی جهانگیری حسین آبادی^۱

^۱ دانشجوی دکتره، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
^۲ ریاست آزمایشگاه بیمارستان دی، تهران، ایران

^۳ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

* نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۲-۴۵۲۲۲۶۹

E-mail: amini90_13@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوک‌ها از جمله باکتری‌های مقاوم و با پراکندگی و گسترش بالا هستند. این باکتری‌ها از جمله نخستین پاتوژن‌های شناخته شده انسانی هستند که می‌توانند بر روی پوست و غشاهای مخاطی کلونیزه شوند^۱. این باکتری به همراه باکتری‌هایی چون *پسودوموناس آئروجینوزا*، *اشریشیاکولی* و *اسیتوباکتر* از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس مسئول بسیاری از عفونت‌های حاد و تهاجمی مانند سپتی سمی، اندوکاردیت و استئومیلیت در افراد بستری در بیمارستان‌ها و از عوامل شایع مرگ‌ومیر در بیماران تحت همودیالیز، مراقبت‌های ویژه و همچنین بیماران بخش جراحی است^{۲،۳}. آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های باکتریایی بیش از ۴۰ سال است که در دسترس قرار دارند. با وجود این حتی در بدو تولید آنتی‌بیوتیک از جمله پنی‌سیلین روشن گردیده بود که برخی از باکتری‌ها به وسیله آنتی‌بیوتیک‌ها از بین نمی‌روند، یعنی باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک وجود داشته است^۴. استافیلوکوک اورئوس کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. به دنبال تولید پنی‌سیلین جی در اواسط سال‌های ۱۹۴۰ بهبودی قابل توجهی در عفونت‌های استافیلوکوکی به وجود آمد اما با ادامه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های مقاوم به ترکیبات پنی‌سیلین به علت توانایی استافیلوکوک‌ها در تولید بتا لاکتامازها در سال ۱۹۴۲ گزارش شد^۵. متی سیلین اولین پنی‌سیلین نیمه صنعتی مقاوم در برابر بتالاکتامازهاست که در سال ۱۹۵۹ به بازار عرضه شد. مدت کوتاهی بعد از تولید متی سیلین در سال ۱۹۶۱ اولین سویه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (MRSA)، در اروپا (انگلستان) شناسایی شد، طی دو دهه گذشته شیوع این سویه در بسیاری از قسمت‌های جهان افزایش یافته است. در دهه ۱۹۸۰ مقاومت به متی سیلین شیوع یافته و به سرعت رو به افزایش نهاد، به طوری که در طی این سال‌ها میزان بالای سویه‌های MRSA به عنوان یکی از مشکلات مهم بالینی و اپیدمیولوژیک در بیمارستان‌ها تبدیل گردید. طبق آمارهای CDC، از آن زمان تاکنون و به ویژه در سال ۲۰۰۴ منتشر نمود ۵۹/۵

درصد از مراکز بهداشتی درمانی ایالات متحده حداقل یک‌بار، مواردی از MRSA را گزارش کرده‌اند^{۶-۷}. مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس با حضور ژن *mecA* تأیید می‌شود. این ژن بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی می‌باشد و یک پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین با میل اتصال کم به نام PBP2a کد می‌کند. بنابراین مانع تأثیر بتالاکتام‌ها بر سنتز دیواره سلولی باکتری می‌شود. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، یکی از علل اصلی و شناخته شده عفونت‌های بیمارستانی است. حدود ۴۱ درصد عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در ایالات متحده ناشی از MRSA است^۸. بیماران کلونیزه شده با MRSA به عنوان یک مخزن برای انتقال بیماری در بیمارستان عمل می‌کنند. این سویه علاوه بر این که یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. اغلب سویه‌ها به طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی مثل داروهای بتالاکتام، تتراسایکلین، ماکرولید، آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها مقاوم هستند و در محیط بیمارستان کلونیزه می‌شوند. بعضی از آن‌ها به سرعت می‌توانند در داخل بیمارستان گسترش یابند. انتشار این سویه‌ها که به آن‌ها MRSA اپیدمیک اطلاق می‌شود^۹، به علت ریشه‌کنی سخت بعد از استقرار در بخش، محدودیت در انتخاب دارو و هزینه بالای درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند^{۱۰}. شیوع MRSA به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی، مراکز نگهداری بیماران، در بیماران دارای زخم باز، بیمارانی که وسایل کارگذاری شده در بدن (پروتز) دارند و همچنین در بیمارانی که ضعف سیستم ایمنی بدن دارند، بیشتر است^{۱۱}. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران آماده برای انجام جراحی پیش و پس از عمل جراحی قلب باز در بیمارستان‌های شریعتی تهران و بیمارستان خصوصی دی و شناسایی و مقایسه فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین در این نمونه‌ها با استفاده از تکنیک مولکولی PCR بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی

نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از ۱۱۰ بیمار متقاضی

تهیه گردید. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد *استاف اورئوس* ATCC 25923 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA

جهت انجام این آزمون، باکتری‌های جداسازی شده را در محیط لوریا برتانی براث کشت داده و سپس بر طبق دستورالعمل کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA (KIT-PR881614 استخراج DNA انجام گردید.

آزمون PCR

برنامه انجام آزمون PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ سیکل)، مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه می‌باشد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون در جدول (۱) ذکر شده است^{۱۳، ۱۴}. مخلوط‌های استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: آب مقطر ۱۶/۸ میکرولیتر، IX. PCR buffer به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، dNTP mix (5Mm) به میزان ۰/۲ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هرکدام ۱/۵ میکرولیتر، آنزیم *Taq polymerase* به میزان ۰/۱ میکرولیتر، نمونه DNA ۲/۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. آزمون PCR در دستگاه Biorad-T100 انجام شد. جهت بررسی محصول PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داگ Biorad مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

عمل جراحی قلب باز (قبل از عمل جراحی) مورد مطالعه در بیمارستان خصوصی دی در محدوده زمانی فروردین ۱۳۹۰ تا پایان شهریور ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. جهت جمع‌آوری نمونه‌ها از بینی، زیر بغل و گلو در متقاضیان عمل قلب باز بیمارستان دی، سوآپ پنبه‌ای آغشته به سرم فیزیولوژی استریل در قسمت قدامی سوراخ‌های بینی بیماران، وارد و در هرکدام چند بار چرخانده سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس این نمونه‌ها را بر روی محیط‌های بلاد آگار (مرک، آلمان)، مانتول سالت آگار (مرک، آلمان)، بردپارکر آگار (مرک، آلمان)، و کروم آگار/استاف اورئوس (هایمدیا، هند)، کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. جهت تعیین هویت گونه‌های باکتری از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد که در نهایت ۵۲ جدایه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده شناسایی گردید.

آزمون آنتی‌بیوگرام

جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از روش دیسک گذاری (Disk diffusion) به روش کربی-بائر (Kirby-Bauer) و بر طبق دستورالعمل (Clinical and Laboratory Standards institute) CLSI استفاده گردید^{۱۲}. تعدادی از کلونی باکتری را به وسیله آنس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل نموده تا برابر با کدورت استاندارد نیم مک فارلند گردد، سپس بر روی محیط مولر هیتتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک را بافاصله استاندارد بر روی محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه و بعد از ۲۴ ساعت نتایج قرائت گردید^{۱۲}. جهت انجام این آزمون دیسک-های آنتی‌بیوتیک Tobramycin, Penicillin, Clindamycin, Ciprofloxacin, Piperacillin Chloramphenicol, Oxacillin, Ceftriaxone, Erythromycin, Ceftazidime, Amikacin, Vancomycin, Imipenem, Bactrim, Nitrofurantoin, Linezolid, از شرکت هایمدیا (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA)

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام PCR

پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	ژن هدف	طول محصول
<i>mecA1</i>	5'- AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG-3'	<i>mecA</i>	۵۸۳bp
<i>mecA2</i>	5'- ATGTATGTGCGATTGTATTGC-3'	<i>mecA</i>	۵۸۳bp

Real-Time PCR تشخیصی

این روش با استفاده عوامل متصل شونده به DNA مثل SYBR Green انجام می‌شود. این رنگ از طریق جایگزینی در شیار کوچک DNA به DNA متصل می‌شود. از جمله مزایای این روش ارزان، راحت و حساس بودن آن است. یکی از معایب بزرگ آن این است که با اتصال به دورشته‌هایی مثل پرایمر دایمر و دیگر باندهای غیراختصاصی، نتایج بیشتر از غلظت اصلی برآورد می‌شود و بنابراین بهینه کردن آن باید به صورتی باشد که کمترین مقدار پرایمر دایمر و محصول غیراختصاصی ایجاد گردد. در واکنش PCR هنگامی که DNA به صورت واسرشت (Denaturate) درمی‌آید، سایبر گرین به DNA متصل نمی‌شود، اما در مرحله Annealing و تکثیر DNA، هم‌زمان با دورشته‌ای شدن DNA سایبر گرین در ساختار آن قرار می‌گیرد. به این ترتیب با افزایش DNAهای دورشته‌ای مقدار سایبر گرین متصل شده نیز افزایش می‌یابد و در نتیجه نور فلورسانت بیشتری ساطع می‌شود که شدت نور توسط دستگاه قابل اندازه‌گیری است^{۱۵، ۱۶}.

نتایج

تعیین فراوانی سویه‌های MRSA قبل از عمل جراحی قلب

باز بیمارستان خصوصی دی

از ۱۱۰ بیمار متقاضی جراحی قلب باز (قبل از عمل جراحی) مورد مطالعه در بیمارستان خصوصی دی، ۵۲ بیمار (۴۷/۲۷٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از میان ۵۲ بیمار این بخش حامل استافیلوکوکوس اورئوس ۲۷ نفر مرد (۵۱/۹۲٪) و ۲۵ نفر زن (۴۸/۰۷٪) بودند. میانگین سنی بیماران در این گروه (۶۴/۴۳٪) سال در فاصله سنی ۴ تا ۹۲ سال بود. از میان ۵۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسده از بینی، زیر بغل و کشاله ران بیماران متقاضی جراحی قلب باز ۳۴ ایزوله (۶۵/۳۸٪) حساس به متی سیلین (MSSA) و ۱۸ ایزوله (۳۴/۶۱٪) مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند.

تعیین فراوانی سویه‌های MRSA قبل از عمل جراحی قلب

باز بیمارستان دولتی شریعتی تهران

از ۷۲ بیمار متقاضی جراحی قلب باز (قبل از عمل جراحی) مورد مطالعه در بیمارستان خصوصی دی، ۳۵ بیمار (۴۸/۶۱٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از میان ۳۵ بیمار این بخش حامل استافیلوکوکوس اورئوس ۱۹ نفر مرد (۵۴/۲۸٪) و ۱۶ نفر زن (۴۵/۷۱٪) بودند. میانگین سنی بیماران در این گروه (۶۸/۵۲٪) در فاصله سنی ۵ تا ۸۵ سال بود. از میان ۳۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسده از بینی، زیر بغل و کشاله ران بیماران متقاضی جراحی قلب باز، ۲۲ ایزوله (۶۲/۸۵٪) حساس به متی سیلین (MSSA) و ۱۳ ایزوله (۳۷/۱۴٪) مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند.

تعیین فراوانی سویه‌های MRSA بعد از عمل جراحی قلب

باز در بیمارستان خصوصی دی

از ۹۰ بیمار متقاضی جراحی قلب باز (بعد از عمل جراحی) مورد مطالعه در بیمارستان خصوصی دی، ۵۴ بیمار (۶۰٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از میان ۵۴ بیمار این بخش حامل استافیلوکوکوس اورئوس ۲۴ نفر مرد (۴۴/۴۴٪) و ۲۵ نفر زن (۵۵/۵۵٪) بودند. میانگین سنی بیماران در این گروه ۵۶ سال و در فاصله سنی ۱۸ تا ۸۴ سال بود. از میان ۵۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسده از بینی، زیر بغل و کشاله ران بیماران متقاضی جراحی قلب باز، ۱۸ ایزوله (۳۳/۳۳٪) MSSA و ۳۶ ایزوله (۶۶/۶۶٪) MRSA بود.

تعیین فراوانی سویه‌های MRSA بعد از عمل جراحی قلب

باز در بیمارستان دولتی شریعتی تهران

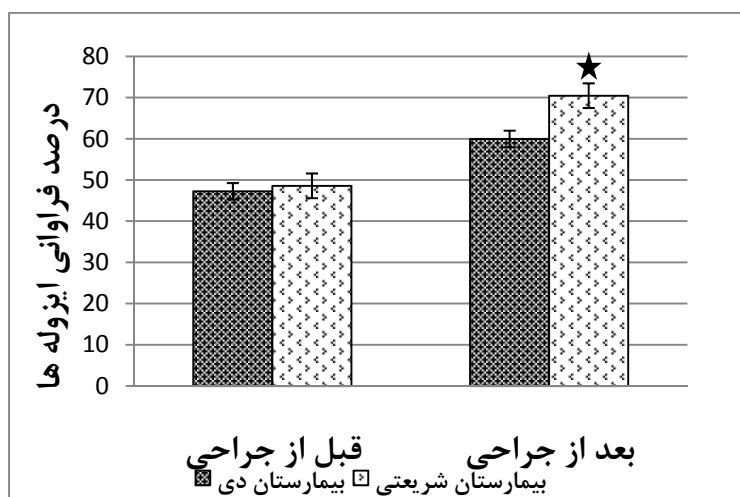
از ۶۱ بیمار متقاضی جراحی قلب باز (بعد از عمل جراحی) مورد مطالعه در بیمارستان خصوصی شریعتی، ۴۳ بیمار (۷۰/۴۹٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از میان ۴۳ بیمار این بخش حامل استافیلوکوکوس اورئوس ۲۳ نفر مرد (۵۳/۴۸٪) و ۲۰ نفر زن (۴۶/۵۱٪) بودند. میانگین سنی بیماران در این گروه ۶۱ سال و در

دادند. لینوزولید بیش از ۸۵ درصد و باکتریم (کوتریموکسازول) بیش از ۷۰ درصد حساسیت را نشان دادند. حساسیت این آنتی‌بیوتیک‌ها به نسبت در بیمارستان شریعتی کمتر گزارش شد و در مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده گردید. یعنی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان شریعتی نسبت به بیمارستان دی بیشتر بوده و احتمال افزایش آن‌هم وجود دارد.

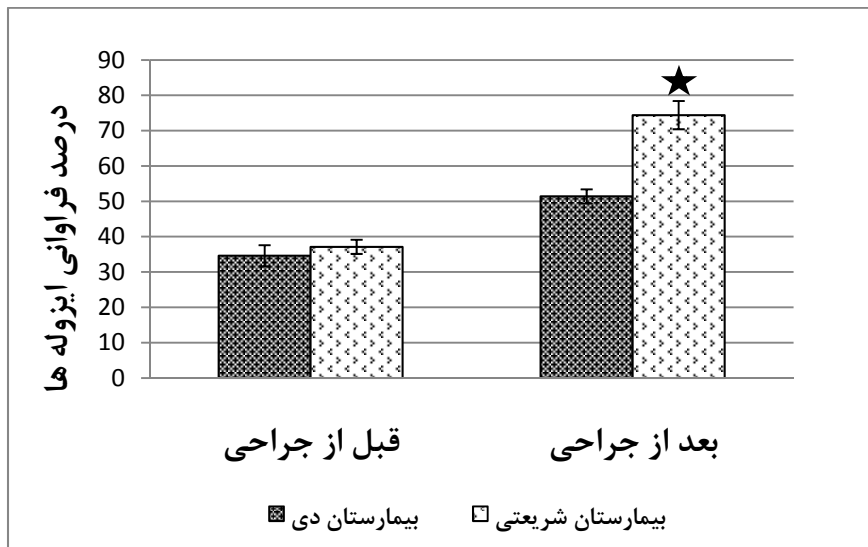
مقایسه سویه‌های MRSA در بیمارستان خصوصی دی و دولتی شریعتی تهران

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش با مقایسه ایزوله‌های قبل و بعد از عمل جراحی قلب باز در این دو بیمارستان مشاهده شد، در بیمارستان خصوصی دی ۴۷/۲۷٪ و در بیمارستان شریعتی تهران ۴۸/۶۱٪ از بیماران متقاضی جراحی قلب باز، قبل از جراحی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد، که با مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید. اما با نمونه‌گیری از بیماران بستری شده پس از جراحی قلب باز، ۶۰٪ از بیماران بستری در بیمارستان خصوصی دی و ۷۰/۴۹٪ از بیماران بستری در بیمارستان دولتی شریعتی تهران *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد که در مقایسه آماری اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) مشاهده گردید (نمودار ۱ و ۲ و ۳).

فاصله سنی ۲۰ تا ۸۹ سال بود. از میان ۴۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بینی، زیر بغل و کشاله ران بیماران متقاضی جراحی قلب باز، ۱۱ ایزوله (۲۵/۵۸٪) MSSA و ۳۲ ایزوله (۷۴/۴۱٪) MRSA بودند. نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام نسبت به ۱۶ آنتی‌بیوتیک مختلف نشان داد، در بین ایزوله‌های حساس به متی‌سیلین، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت به پنی-سیلین و سفنازیدین مشاهده شد که بیش از ۹۰٪ بود و در مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین دو بیمارستان مشاهده نشد. اما دو آنتی‌بیوتیک کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین بیش از ۲۵٪ بعد از جراحی در بیمارستان دی و همچنین بیش از ۵۰٪ در بیمارستان شریعتی حساسیت نشان دادند که در بررسی آماری بین این دو اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. بیشترین مقاومت سویه‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰٪ در هر دو بیمارستان قبل و بعد از عمل جراحی مشاهده گردید. مقاومت آنتی‌بیوتیکی آگراسیلین ۱۰۰٪ بعد از جراحی در هر دو بیمارستان مشاهده شد ولی قبل از جراحی این آنتی‌بیوتیک مقاومت در حدود ۹۰٪ نشان داد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سفنازیدین ۱۰۰٪ بعد از جراحی در بیمارستان خصوصی دی مشاهده شد، ولی در بیمارستان شریعتی تهران ۹۷٪ بود که در مقایسه آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. بیشترین حساسیت سویه‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و ونکومایسین بیش از ۹۵ درصد حساسیت را نشان



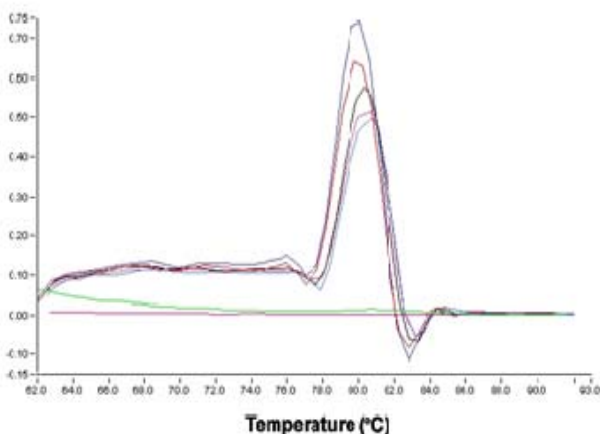
نمودار ۱: نشان‌دهنده مقایسه درصد فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو بیمارستان خصوصی دی و دولتی شریعتی تهران است. علامت (★) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) است.



نمودار ۲: نشان‌دهنده مقایسه درصد فراوانی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در دو بیمارستان خصوصی دی و دولتی شریعتی تهران است. علامت (★) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) است.

بودند. با انجام PCR و ردیابی این ژن ۹ مورد از ۳۰ ایزوله مزبور (۳۰٪) واجد ژن *mecA* تشخیص داده شدند. در این روش نشان داده شد که روش ژنوتیپی در مقایسه با روش فنوتیپی برای تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین دارای حساسیت بیشتری می‌باشد.

نتایج Real Time PCR



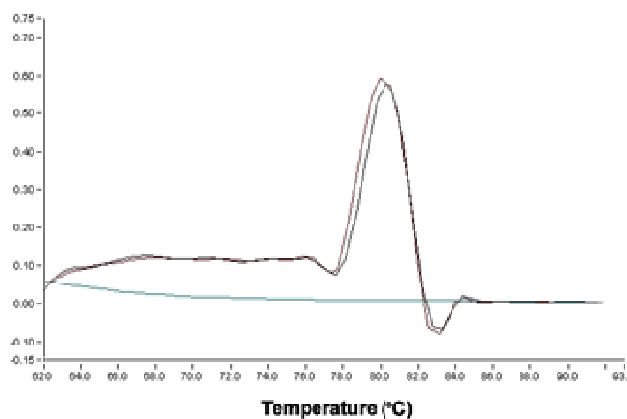
نمودار ۱: منحنی ترسیم‌شده نقطه ذوب ایزوله‌ها در واکنش Real Time PCR

در این پژوهش نتایج حاصل از مقایسه ایزوله‌های قبل و بعد از عمل جراحی قلب باز در این دو بیمارستان نشان داد، در بیمارستان خصوصی دی ۳۴/۶۱٪ و در بیمارستان دولتی شریعتی تهران ۳۷/۱۴٪ از بیماران متقاضی جراحی قلب باز، قبل از جراحی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شد، که با مقایسه آماری اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید. اما با نمونه-گیری از بیماران بستری شده پس از جراحی قلب باز، ۵۱/۴۲٪ از بیماران بستری در بیمارستان خصوصی دی و ۷۴/۴۱٪ از بیماران بستری در بیمارستان دولتی شریعتی تهران استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شد که در مقایسه آماری اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) مشاهده گردید (نمودار ۲).

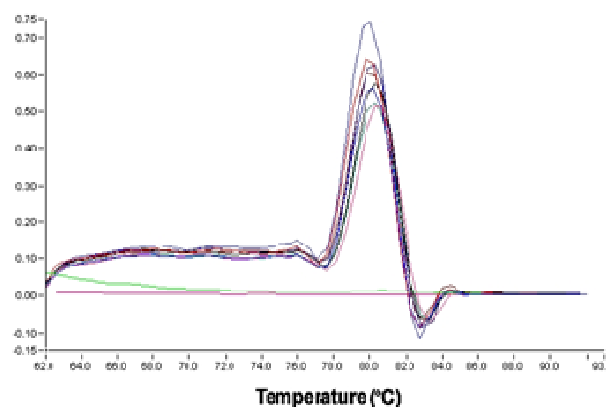
آزمون تعیین فراوانی سویه MRSA (ژن *mec-A*) به روش PCR

از بین نمونه‌های جدا شده استاف اورئوس، از هر دو گروه بیماران متقاضی قبل عمل و بعد از عمل جراحی قلب باز، ۳۰ ایزوله جهت اثبات ژن *mecA* با روش مولکولی انتخاب گردید. از میان این ۳۰ نمونه ایزوله استاف اورئوس ۶ نمونه (۲۰٪) مقاوم به متی‌سیلین، که در روش فنوتیپی (به آگراسیلین مقاومت نشان دادند)

اورئوس که به‌عنوان دومین پاتوژن بیمارستانی محسوب می‌شود، بخشی از فلور طبیعی پوست و مجاری بینی می‌باشد. این ارگانیزم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط دارابی و همکاران در سال ۱۳۸۹ با عنوان ویژگی‌های مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بیماران و کارکنان بیمارستانی ارتش انجام شد، گزارش کردند که ۹۰ درصد سویه‌ها مقاوم به متی‌سیلین و ۲۵ درصد سویه‌ها نسبت به کلیندامایسین مقاوم هستند^{۱۸}. اما در این پژوهش از بیماران متقاضی عمل جراحی قلب باز قبل از جراحی ۴۷/۲۷٪ در بیمارستان خصوصی دی و ۴۸/۶۱٪ در بیمارستان دولتی شریعی تهران حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که برخلاف گزارش دارابی و همکاران بود. از میان بیماران این بخش که حامل *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند، ۲۷ نفر مرد (۵۱/۹۲٪) و ۲۵ نفر زن (۴۸/۰۷٪) بودند. که نشان‌دهنده عدم وابستگی به جنسیت بیماران داشت و همچنین از میان ۵۲ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بینی، زیر بغل و کشاله ران بیماران متقاضی عمل جراحی قلب باز ۳۴/۶۱٪ در بیمارستان خصوصی دی و همچنین ۳۷/۱۴٪ در بیمارستان دولتی شریعی تهران مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بودند که برخلاف نتایج پژوهش دارابی و همکاران که ۹۰٪ ایزوله‌ها مقاوم به متی‌سیلین بود، مشاهده شد. نجار پیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۹ تحقیقی با عنوان شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از طریق انتشار دیسک و PCR و بررسی الگوی مقاومتی آن بر این باورند که *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله عوامل مهم ایجاد عفونت‌های شدید بوده و سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین این باکتری بیشترین عامل مرگ‌ومیر در بیمارستان‌ها می‌باشند، لذا شناسایی و درمان سریع سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین دارای اهمیت می‌باشد^{۱۹}. در پژوهش حاضر نیز با مقایسه روش شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی از PCR برای اثبات ژن *mecA* در شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. از بین نمونه‌های ایزوله ۲۰٪ مقاوم به متی-سیلین به روش فنوتیپی بودند. با انجام PCR و ردیابی این ژن ۳۰٪ واجد ژن *mecA* بودند. در اسپانیا در سال ۲۰۰۲ میزان عفونت‌های ناشی از MRSA ۲۴/۵٪، و در ایرلند، ایتالیا و فرانسه به ترتیب ۴۱/۴٪، ۴۰/۱٪ و ۳۳/۱٪ بوده است^{۲۰}. در مطالعه رازین و همکاران در طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ با روش دیسک دیفیوژن از ۱۴۳ مورد



نمودار ۲: منحنی ترسیم‌شده نقطه ذوب ایزوله‌ها در واکنش Real Time PCR



نمودار ۳: منحنی ترسیم‌شده نقطه ذوب ایزوله‌ها در واکنش Real Time PCR

بحث و نتیجه‌گیری

در عصر حاضر، عفونت ناشی از *استافیلوکوکوس* های کوآگولاز منفی و کوآگولاز مثبت به یکی از جدی‌ترین تهدیدهای پزشکی تبدیل شده است. این در حالی است که مطالعات مختلف از سال‌ها پیش تاکنون افزایش گسترده‌ای را در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در اعضای این جنس نشان می‌دهد^{۱۷}. مقاومت به آنتی‌بیوتیک یکی از مشکلات عمده بوده و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها نقش عمده‌ای در ظهور باکتری‌های مقاوم بازی می‌کند. *استافیلوکوکوس*

۸۰٪ مشاهده گردید. با استفاده از روش PCR می‌توان در کوتاه‌ترین مدت زمان با ویژگی و حساسیت بالا به حضور ژن‌های بیماری‌زا پی برد و با درمان مناسب و بموقع از ایجاد سویه‌های مقاوم و انتقال این ژن‌ها در جمعیت‌های انسانی جلوگیری به عمل آورد^{۲۳،۲۴}. جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید دو فاکتور عمده یعنی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت^{۲۱،۲۵}. اقدامات کنترل عفونت و رعایت نکات بهداشتی در حذف یا کاهش این نوع سویه‌ها بویژه در بیمارستان‌ها باید بسیار جدی گرفته شود^{۲۶}. همچنین ضمن استاندارد شدن روش آنتی‌بیوگرام باید به نتایج تست حساسیت آنتی‌میکروبی عفونت‌ها جهت کاربرد صحیح آنتی‌بیوتیک مؤثر، توجه ویژه‌ای صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به کاهش معنی‌دار جداسازی سویه‌های مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس پس از انجام جراحی قلب باز در بیمارستان خصوصی دی نسبت به بیمارستان دولتی شریعتی تهران، می‌توان گفت که احتمالاً شرایط، رسیدگی و مدیریت بیمارستان خصوصی بهتر از دولتی می‌باشد. منبع اصلی و مسیر انتقال این سویه‌ها کارکنان و بیماران می‌باشند. تشخیص آزمایشگاهی و تعیین نوع این سویه‌های مهم از نظر پزشکی در درمان، حذف و پیشگیری از عفونت‌های بیمارستانی بسیار مهم می‌باشند. اقدامات کنترل عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و رعایت نکات بهداشتی در حذف یا کاهش سویه‌های مقاوم به‌ویژه در بیمارستان‌ها باید بسیار جدی گرفته شود^{۲۶}. همچنین ضمن استاندارد شدن روش آنتی‌بیوگرام باید به نتایج تست حساسیت آنتی‌میکروبی عفونت‌ها جهت کاربرد صحیح آنتی‌بیوتیک مؤثر، توجه ویژه‌ای صورت گیرد.

استافیلوکوکوس اورئوس جداسده از نمونه‌های بیماران ۱۱۳ نمونه (۷۹٪) به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین گزارش شد^{۲۱}. افتخار و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی ۶ ماهه در ۵ بیمارستان از ۲۴۹ نمونه بستری‌شده در بخش ICU ۷۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا کردند که همگی مقاوم به متی‌سیلین بودند. بیشترین جدایه‌ها از خون (۴۲/۹٪) و زخم (۲۱/۴٪) این بیماران به دست آمد^{۲۲}. در پژوهش حاضر، ۶۰٪ بیماران پس از جراحی قلب باز در بیمارستان خصوصی دی و ۷۰/۴۹٪ از بیماران بستری‌شده در بیمارستان دولتی شریعتی تهران، حامل استافیلوکوکوس اورئوس بودند. از میان ۴۴٪ مرد و ۶۶٪ زن بودند که نشان‌دهنده عدم وابستگی به جنسیت بیماران داشت. همچنین با مقایسه بین ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسده در دو بیمارستان خصوصی دی و دولتی شریعتی تهران افزایش معنی‌داری در ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین مشاهده گردید که احتمالاً مربوط به مسائل مدیریتی و همچنین رعایت اصول بهداشتی در این دو بیمارستان است. رشیدی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۶ با نمونه‌برداری و بررسی ۲۹۹ بیمار بستری در بیمارستان ۱۰۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا کردند که ۹۵٪ نمونه‌ها مقاوم به متی‌سیلین بود که ۹۴٪ از آن‌ها به پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند و ۹۱٪ ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه بودند^{۱۳}. در پژوهش حاضر نیز با انجام آزمون آنتی‌بیوگرام بیشترین مقاومت ایزوله‌های MRSA پیش از انجام عمل جراحی قلب باز نسبت آنتی‌بیوتیک آگراسیلین ۹۵٪، اریترومایسین، سفتریاکسون و سفنازیدیم ۸۹٪ و پیراسیلین ۷۸٪، کلیندامایسین و سیپروفلوکساسین ۶۷٪ مشاهده شد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی پس از عمل جراحی قلب باز نسبت به آنتی‌بیوتیک آگراسیلین ۱۰۰٪، اریترومایسین و سفنازیدیم ۹۷٪، سیپروفلوکساسین ۸۹٪، امیکاسین و کلیندامایسین ۸۳٪ و ایمپنم

References

- Japoni A, Alborzi A, Orafa F, Rasouli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Iranian Biomedical Journal*. 2004;8(4):173-8.
- Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(3):505-20.
- Saderi H, Owlia P, Zafarghandi N. Evaluation of antibiotic resistance in *Staphylococcus Aureus* isolated from nose of two teaching hospitals staff of Shahed University. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2004;14(42):69-75.[In Persian]
- Long SS, Prober CG, Fischer M. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2017.

5. El-Din SAS, El-Shafey E, Mohamad R, El-Hadidy M, El-Din A, El-Hadidy M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a problem in the burns unit. *Egyptian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003;27:1-10.
6. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(11):7687-92.
7. Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(3):455-62.
8. Folden D, Machayya J, Sahmoun A, Beal J, Holzman G, Helgerson S, et al. Estimating the proportion of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: two definitions used in the USA yield dramatically different estimates. *Journal of Hospital Infection*. 2005;60(4):329-32.
9. Murchan S, Aucken H, O'Neill G, Ganner M, Cookson B. Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(11):5154-60.
10. Dantes R, Mu Y, Belflower R, Aragon D, Dumyati G, Harrison LH, et al. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. *JAMA internal medicine*. 2013;173(21):1970-8.
11. ElmakkMisk Elyamen A, Elemam OBAB, Ahmed EEO. Molecular detection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients with urinary tract infections in Khartoum State. 2014.
12. Wayne P. USA: CLSI; 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Second Informational Supplement CLSI Document M100-S22.
13. Rashidi Nezhad R, Meybodi SM, Rezaee R, Goudarzi M, Fazeli M. Molecular Characterization and Resistance Profile of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Intensive Care Unit, Tehran-Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2017;10(3).[In Persian]
14. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*. 2002;70(2):631-41.
15. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(5):1875-84.
16. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5578-81.
17. Oryan G, Faghri J, Fazeli H, Zandi A, Hosseini N-S, Sedighi M, et al. Prevalence and Antibacterial Resistance of Coagulase Negative Staphylococci in Keratitis Infections Following the Use of Soft Contact Lenses. *Journal of Isfahan Medical School*. 2014;(32)277.[In Persian]
18. Alizadeh S, Amini K. Identification of Virulence Gene Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Resistance to Methicillin (mecA) in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Clinical Specimens: A Short Report. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2015; 14(5): 427-34. [In Persian]
19. Najar PS, Azimian A, Mostafaei M, Siadat S. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by disk diffusion method, determination of MIC and PCR for mecA gene. 2009.
20. Oteo J, Baquero F, Vindel A, Campos J. Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000–2002). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(6):1033-8.
21. Razin bahram S, Nabavi M, Nikdokht T, Haghighi M, Forumand M. Determine the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection Imam Hussein hospital in the years 1386- 87. *pajohandeh Med J* 1388;5(14):263-7.[In Persian]
22. Eftekhari F, Rezaee R, Azad M, Azimi H, Goudarzi H, Goudarzi M. Distribution of adhesion and toxin genes in staphylococcus aureus strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 2017;5(1).
23. Nijjar CK, Smith MH, Eltringham IJ. Adjunctive mecA PCR for routine detection of methicillin susceptibility in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(5):1678-81.
24. Shaw AG, Vento TJ, Mende K, Kreft RE, Ehrlich GD, Wenke JC, et al. Detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* colonization of healthy military personnel by traditional culture, PCR, and mass spectrometry. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2013;45(10):752-9.
25. Bhatt P, Tandel K, Singh A, Kumar M, Grover N, Sahni A. Prevalence and molecular characterization of methicillin resistance among Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care center. *Medical Journal Armed Forces India*. 2016;72:S54-S8.
26. Xiao Y. Nosocomial Infections and Bacterial Resistance. *Infectious Microecology*: Springer; 2014. p. 83-131.

Marziyeh Sadat Amini^{*1},
Faramarz Soleymanloo², Sajad
Alizadeh¹, Hadi Feizi³, Yashar
Bagherizadeh¹, Mohammad
Movagharneshad¹, Mehdi
Jahangiri-Hoseinabadi¹

¹ Department of Microbiology,
Kazerun Branch, Islamic Azad
University, Kazerun, Iran

² Head of Laboratory Dey
Hospital, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology,
Zanjan Branch, Islamic Azad
University, Zanjan, Iran

Identification and Comparison of Methicillin Resistance *mecA* Gene in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Clinical Specimens Before and After Open Heart Surgery in Shariati Hospital in Tehran and in Dey Private Hospital

Received: 30 Dec. 2017 ; Accepted: 20 Aug. 2018

Abstract

Background and Aim: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main causes of hospital infections. MRSA is resistant to all beta-lactams due to the presence of the *mecA* gene. The aim of this study was to isolate and identify the methicillin resistance gene of *Staphylococcus aureus* by PCR technique, before and after open heart surgery in Day and Shariati hospital.

Materials and Methods: After collecting samples, various biochemical and microbiological tests were performed and then antibiotic susceptibility test using disc diffusion method based on CLSI instructions with antibiotics from different groups. It were used turned out to determine the resistance gene, PCR and Qpcr.

Results: The results showed that the prevalence of *mecA* gene in clinical samples was 30% and there was a significant difference in the frequency of isolates of *Staphylococcus aureus* and MRSA in two hospitals of Day and Shariati. Among the antibiotics, the resistance before the operation of the open heart surgery was 95% for the oxacillin antibiotic and the antibiotic resistance after the surgery was higher than that for oxacillin 100%, erythromycin and, Cefazidime 97%, which was tested more than the other antibiotics.

Conclusion: Because of the importance of *Staphylococcus aureus* as the most important pathogenic pathogen and considering the significant reduction of MRSA isolation after open heart surgery in the private hospital of Day in comparison with Shariati Hospital, It can be concluded that it is likely that the environmental conditions and the principles of sterilization in private hospitals are much better than government hospitals.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiogram, *mecA*, PCR

***Corresponding Author:**
Department of Microbiology,
Kazerun Branch, Islamic Azad
University, Kazerun, Iran

Tel: 0912-4527269
E-mail: amini90_13@yahoo.com