مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۱، بهار ۹۷، صفحات ۷۴ تا ۸۰

Original Article

بررسی مقاومت دارویی سویه های استافیلوکوکوس اوررئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین در برخی از بیمارستان‌های شهر رشت

الهام امیری[1]، معصومه انوری[2]

[1]کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه
[2]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است و نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، بررسی فنوتیپی و مولکولی ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیمارستان‌های شهر رشت در یک دوره شش ماهه (بهمن ۹۴ تاتیر ۹۵) بود.*

روش بررسی: *۲۱۷ نمونه بالینی از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های شهر رشت جمع آوری شدند. ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. جهت تعیین مقاومت میکروبی سویه‌ها به آنتی بیوتیک ونکومایسین از آزمون‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن (طبق دستورالعمل CLSI) و حداقل غلظت مهار کنندگی به روش ماکرودایلوشن براث استفاده شد. همچنین حضور ژن VanA، کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در ایزوله های جدا شده، به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *۶۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین هویت شدند. در تست تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل ۱۰/۵درصد، جنتامایسین ۲۵/۳۷درصد، تتراسایکلین ۳۷/۳۲درصد، ونکومایسین ۳۸/۸۰ درصد، اگزاسیلین ۴۴/۷۰درصد، پنی‌سیلین ۱۰۰درصد بود. در روش ماکرودایلوشن براث، ۲۲/۴ درصد نمونه‌ها مقاومت به ونکومایسین را نشان دادند. در روش PCR، برای ژن VanA باندی مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: توصیه می‌شود در مطالعات *مولکولی، حضور ژن‌های VanA و VanB هر دو بررسی شود، چرا که علت مقاومت می‌تواند مربوط به حضور ژن VanB باشد.*

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، ونکومایسین، مقاومت آنتی بیوتیکی، VanA.*

مقدمه

از دهه ۸۰ میلادی تاکنون میکروارگانیسم‌های گرم مثبت به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عامل اصلی عفونت-های بیمارستانی معرفی شده‌اند (۱). استافیلوکوکوس اورئوس عامل ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها، مانند عفونت‌های خفیف پوستی و بیماری‌های سیستمیک تهدید کننده حیات مانند سپتی‌سمی، اندوکاردیت، پنومونی و آبسه‌های عمیق پوستی است (۴-۲). این باکتری از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است و نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها و .... مقاومت نشان می‌دهد. همچنین این باکتری از نظر ایجاد عفونت‌های بیمارستانی پس از سودوموناس آئروژینوزا در مرتبه دوم قرار دارد. کانون‌های عفونت ناشی از این باکتری به طور عمده زخم، ترشحات دستگاه تنفسی و پوست هستند (۵). از دیگر دلایل اهمیت استافیلوکوکوس اورئوس می‌توان به مقاومت نسبت به انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل استفاده بیش از حد

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، الهام امیری (**email**: Elham.amiri56@ yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۲/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۴/۲۰

آنتی‌بیوتیک‌ها، توانایی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای حاوی ژن‌های مقاومت اشاره کرد (۶).

مکانیسم‌های متفاوتی جهت ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارد. این باکتری با تولید بتالاکتاماز نسبت به بسیاری از پنی سیلین‌ها مقاوم می‌شود. همچنین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام (نفسیلین، متی سیلین و اگزاسیلین) نیز به وسیله تغییر در پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین ایجاد می‌شود (۷). مقاومت پلاسمیدی نسبت به تتراسیکلین‌ها، ماکرولیدها، آمینوگلیکوزیدها و آنتی بیوتیک‌های دیگر نیز در این باکتری شایع است. با افزایش مقاومت نسبت به متی سیلین، از ونکومایسین جهت درمان این باکتری‌ها استفاده شد (۹،۸).

ونکومایسین گلیکوپپتیدی است که در ساخت دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند. اطلاعات ژنتیکی مقاومت به ونکومایسین در اپرون *VanA* قرار دارد. این عامل سیستمی از ژن‌های قابل انتقال از طریق پلاسمید است (۱۰). مهم‌ترین ژن‌های مقاومت در استافیلوکوکوس‌ها شامل *VanA*، *VanB*، *VanC1* و *VanC2/C3* هستند. ژن‌های *VanA* و *VanB* به عنوان مهم‌ترین ژن‌های مسئول مقاومت به ترتیب بر روی ترانسپوزون‌های Tn1546 و Tn1547 قرار دارند که می‌توانند بر روی کروموزوم یا پلاسمید یافت شوند. ژن‌های *VanC1* و *VanC2/C3* کروموزومی هستند (۱۳-۱۱). اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین در سال ۲۰۰۲ از بیماری در کشور آمریکا جدا شد. بررسی‌ها نشان داده‌اند این سویه هم دارای ژن مقاومت نسبت به ونکومایسین(*Van*) و نیز ژن مقاومت نسبت به متی سیلین(*mecA*) است (۱۴).

مصرف بیش از حد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک در درمان و همچنین وقوع جهش و انتقال ژنهای مقاومت از جمله دلایل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف محسوب می‌شود. با توجه به شیوع بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و پتانسیل این ارگانیسم در ایجاد عفونت‌های شدید، لزوم انجام تحقیقات وسیع و جامع بر روی استافیلوکوکوس اورئوس کاملاً احساس می‌شود. مطالعه حاضر جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین جدا شده از سطح بیمارستان‌های شهر رشت در یک دوره شش ماهه (بهمن ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵) انجام گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه، تعداد ۲۱۷ نمونه در یک دوره شش ماهه (بهمن ۱۳۹۴ تا تیر ۱۳۹۵) از نمونه‌های مختلف بالینی (زخم، خون، ادرار، ترشحات تناسلی وترشحات تنفسی) از مراکز درمانی و بیمارستان‌های شهر رشت جمع آوری شد.

مواد و وسایل لازم شامل دیسک‌های آنتی بیوتیک، محیط کشت، گلیسرول ،آمپول ونکومایسین ۵۰۰ میلی گرمی، الکل ۷۰ درصد، کیت رنگ آمیزی گرم، روغن ایمرسیون، پرایمر ،مسترمیکس(dNTPs=0/5µL ، Mgcl2=1/5µL، آنزیم Taqپلیمراز = 0/5 µL، بافرTBE1x µL=2/5) ، DNA الگو، لدر، پاور لود و پودر آگارز، انکوباتور، پنس استریل، سوآپ استریل، پیپت و پوآر، میکروسکوپ نوری، فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، لوله آزمایش ، جا لوله‌ای، دستگاه الکتروفورز، دستگاه میکروسانتریفوژ ترموسایکلر و سمپلر بودند.

جداسازی میکروارگانیسم

نمونه‌های دریافت شده از بیماران ابتدا روی محیط بلاد آگار و نوترینت آگار کشت داده شدند. گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد شامل تست کاتالاز،کواگولازو تخمیر مانیتول روی محیط مانیتول سالت آگار (Manitol Salt agar) تعیین هویت شدند.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

پس از جداسازی نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی با انجام تست آنتی بیوگرام از طریق روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)، با استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیکی ونکومایسین (۳۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg) و اگزاسیلین (۱µg) تعیین شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی از شرکت پادتن طب خریداری شدند. بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج آن ثبت شد. برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimal Inhibitory Concentration) به روش مایکرودایلوشن براث از پودرآنتی بیوتیک ونکومایسین ۵۰۰ میلی گرمی متعلق به شرکت داروسازی دلتا بر اساس استاندارد CLSI استفاده شد. ابتدا رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان محلول ذخیره آنتی بیوتیکی جهت انجام MIC، روزانه تهیه شد. غلظت آنتی بیوتیک جهت MIC از یک

جدول ۱. مشخصات پرایمر *Van A*

طول محصول PCR	توالی پرایمری	نام پرایمر
1032bp	5'-ATGAATAGAATAAAAGTTGC-3'	*VanA* Forward
	3'-TCACCCCTTTAACGCTAATA-5'	*VanA* Reverse

میکروگرم بر میلی لیتر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتربود. تعیین MIC بر اساس جدول CLSI صورت پذیرفت. به این منظور، جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت براث در غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس اولین لوله از راست به چپ که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MIC ثبت شد. در این مطالعه، از سویه استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد *PTCC*1189 به عنوان شاهد استفاده شد.

بررسی مولکولی مقاومت به ونکومایسین

در ابتدا جدایه‌ها در محیط نوترینت براث کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شد. در این تحقیق از یک جفت پرایمر *VanA* جهت شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک ونکومایسین استفاده شد.

جهت تأیید استخراج DNA، نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از حصول اطمینان از تشکیل تک باند، اجزای واکنش PCR در حجم نهایی۲۵ µl با استفاده از کیت AccuPower® PCR PreMix (شرکت BIONEER، کره جنوبی) با افزودن DNA ژنومی، جفت پرایمر (۱۰۰ µM) و آب استریل به محلول PreMix (حاوی آنزیم، کوفاکتور و بافر مخصوص) آماده شد. سنتز پرایمرهای مورد استفاده که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است، توسط شرکت BIONEER صورت گرفت (۱۵). واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر ۴۸ Labcycler (SensoQuest GmbH، آلمان) طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه توسط افزار SPSS تحلیل شد. مقایسه سطوح مختلف عوامل متغیر مورد بررسی (آنتی بیوتیک، جنسیت، سن و نوع نمونه) توسط آزمون HSD (اختلاف معنی دار حقیقی) صورت گرفت. سپس تحلیل نتایج با استفاده از آزمون آماره فیشر (تجزیه واریانس یک طرفه) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها

از میان نمونه‌های جمع آوری شده، ۶۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس تست‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند. از این ۶۷ مورد، ۸ جدایه از بیماران مرد و ۵۹ جدایه از بیماران زن بودند. از این تعداد، ۱۷ نمونه زخم، ۳ نمونه ترشحات تنفسی، ۲ نمونه خون، ۴۴ نمونه ادرار و ۱ نمونه ترشحات تناسلی بودند. حداقل و حداکثر سن در نمونه‌های بالینی ۱ تا ۸۵ سال بود. پس از تعیین هویت نسبت به تحلیل نتایج اقدام شد. توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب نمونه در جدول ۲ نمایش داده شده است که نشان می‌دهد بیشترین ایزوله ها مربوط به نمونه ادرار بودند.

نتایج حاصل از تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن نشان داد باکتری‌های جدا شده بیشترین مقاومت را نسبت به آمپی سیلین (۱۰۰٪) و کمترین مقاومت را نسبت به کلرامفنیکل (۱۰/۴٪) داشتند. از مجموع ۶۷ نمونه بالینی، در دیسک دیفیوژن ۳۸/۸۰ درصد مقاوم و ۶۱/۲۰ درصد حساس به ونکومایسین بودند. در تست حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن بر روی ۶۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت ایزوله‌ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک مختلف براساس جدول CLSI به ترتیب زیر بود: پنی‌سیلین ۱۰۰ درصد، اگزاسیلین ۴۴/۷ درصد، ونکومایسین ۳۸/۸۰ درصد، تتراسایکلین ۳۷/۳۲ درصد، جنتامایسین۲۵/۳۷ درصد و کلرامفنیکل ۱۰/۵ درصد (جدول ۳). در روش MIC، ۲۲/۴درصد مقاوم، ۹ درصد نیمه حساس و ۶۸/۷ درصد حساس به ونکومایسین بودند. دامنه MIC ونکومایسین سویه‌های آزمایش شده بین یک میکروگرم برمیلی لیتر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

جدول ۲. توزیع فراوانی مطلق ونسبی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد نمونه	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
ادرار	۴۴	۳۲/۵۰	۹/ ۸	۵۷/۷۰
خون	۲	۴۶/۷	۶/۶	۴۶/۷
زخم	۱۷	۵۷	۱۳/۲	۲۹/۸
مجرای تناسلی	۱	۸۳/۳	۱۶/۷	-
مجرای تنفسی	۳	۵۷	۱۱/۱	۲۹/۸

جدول ۳. نتایج آنتی‌بیوگرام مربوط به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده به روش دیسک دیفیوژن (تفسیر نتایج براساس جدول CLSI))

آنتی بیوتیک	مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)
ونکومایسین	۳۸/۸۰	_	۶۱/۲۰
اگزاسیلین	۴۴/۷	۱/۶	۵۳/۷
جنتامایسین	۲۵/۳۷	۱۰/۵	۶۴/۱۸
تتراسایکلین	۳۷/۳۲	۲۳/۸۸	۳۸/۸۰
پنی سیلین	۱۰۰	_	_
کلرامفنیکل	۱۰/۵	۲۸/۳۵	۶۱/۲۰

جدول ۴. نتایج MIC مربوط به ونکومایسین (تفسیر نتایج براساس جدول CLSI

تعداد نمونه ها	مقدار کدورت	حساس	نیمه حساس	مقاوم	درصد
۱۵	≥۱۶	-	-	+	۲۲/۴
۶	۴-۸	-	+	-	۹
۴۶	≤۲	+	-	-	۶۸/۷

بیشترین MIC ونکومایسین به دست آمده برابر با یک میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد (جدول ۴).

در این مطالعه، بررسی حضور ژن مقاومت *VanA* با استفاده از پرایمر اختصاصی بر روی تمامی ایزوله های جدا شده انجام گرفت. نتایج تست PCR نشان داد که هیچ یک از نمونه‌ها دارای ژن *VanA* نبودند.

بحث

امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها، افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده می‌شود. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌های بیماری‌زا به عنوان چالش مهمی برای جامعه پزشکی در درمان بیماری‌های عفونی مطرح شده است. استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت و از مهم‌ترین پاتوژن های انسانی است که دارای مقاومت ذاتی به انواعی از آنتی بیوتیک‌ها است. در سال‌های اخیر وقوع جهش‌های مختلف و دریافت ژن‌های مقاومت از سایر میکروارگانیسم‌ها به خصوص انتروکوک‌ها باعث افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های بالینی شده است. ونکومایسین، آنتی بیوتیک گلیکوپپتیدی است که به طور گسترده‌ای در درمان بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه مقاومت به داروهای مختلف از جمله ونکومایسین در جهان رو به افزایش است و شاهد مقاومت چند دارویی در انواع مختلف پاتوژن‌ها هستیم (۱۶). در این تحقیق، میزان وابستگی (رابطه) جنسیت، سن و نوع نمونه با عفونت محاسبه شد. در بررسی انجام شده بین جنسیت با میزان عفونت و سن با عفونت در برابر آنتی بیوتیک‌های استفاده شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$)، اما بین نوع نمونه با عفونت اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). در بررسی مهاجری و همکارانش، اختلاف معنی‌داری در این مورد وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). سن و جنسیت مستقل از عفونت است (۱۷) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

در این تحقیق، از نظر میزان مقاومت میکروبی، پنی سیلین بالاترین میزان مقاومت میکروبی (۱۰۰ درصد) و کلرامفنیکل پایین ترین میزان مقاومت میکروبی (۱۰/۴ درصد) را داشت

(P<۰/۰۵). نتـــایج مطالعـــه کارماهاپـــاترا و همکـــارانش در سـال۲۰۱۱ نشـان داد کـه ۲۶/۶۷درصدسـویه‌هـا مقـاوم بـه جنتامایسین، تتراسایکلین، کلرامفینکل وونکومایسین بودند که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (۱۸). در مطالعه صفدری و همکـارانش (سـال ۱۳۹۰) میـزان مقاومـت بـه پنـی سـیلین ۹۷درصد ومقاومت به اگزاسیلین ۶۳ درصد گزارش شد کـه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (۱۹)؛ این نتایج با نتایج مطالعه حاضر در مقاومت به پنی سـیلین هـم خـوانی دارد.

در مطالعه حاضر، میـزان مقاومـت بـه ونکومایسـین بـه روش ماکرودایلوشن براث (MIC) ۲۲/۴ درصد گزارش شد. علت این امر می‌تواند مربوط به مصرف بیش از اندازه آنتـی بیوتیـک در این منـاطق و انتشـار کلـون‌هـای تحـت فشـار مصـرف آنتـی بیوتیکی باشد. در مطالعه احمـدی شـعار و همکـارانش (سـال ۱۳۸۵) در تبریز هیچ مورد مقاوم و یا دارای حساسیت متوسط نسبت به ونکومایسین گزارش نشـد. دامنـه MIC سـویه‌هـای آزمایش شـده بـه ونکومایسـین را بـین ۱/۵-۳gμ/ml گـزارش کرده‌اند (۲۰). نتایج فوق با مطالعه حاضـر مشـابهت نـدارد. در ایـن مطالعـه، ۹ درصـد سـویه‌هـا مقاومـت حـد واسـط بـه ونکومایسین نشان دادند. در مطالعه‌ای کـه توسـط نیکـولتی و همکارانش (سال ۲۰۰۶) انجام شد، تنها ۷ درصد از سویه‌هـای استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت حد واسـط بـه ونکومایسـین داشتند (۲۱). نتایج فوق با نتـایج حاصـل از پـژوهش مـا هـم خوانی دارد.

در این تحقیق، ۶۸/۷ درصد سویه‌هـا بـه روش MIC حسـاس بودند. در مطالعه تاتی و همکارانش (سال ۲۰۱۱) در حیدرآباد از مجموع ۳۵۸ جدایـه اسـتافیلوکوکوس اورئـوس، تعـداد ۱۶ سویه (۴/۵ درصد) MIC در حـدود ۸-۴ میکروگـرم در میلـی لیتر را نشان دادند که به عنوان VISA گزارش شدند (۲۲).

به طور کلی، با توجه به نتایج حاصـل از تسـت آنتـی بیـوگرام جدایه‌های مورد مطالعـه در تحقیـق حاضـر، مـوثرترین آنتـی بیوتیـک‌هـا در ایـن تحقیـق کلرامفنیکـل (۱۰/۴درصـد)، جنتامایسین (۲۵/۳۷ درصد)، تتراسایکلین (۳۲/ ۳۷ درصـد) و ونکومایسین (۳۸/۸۰درصد) بودند. همچنین بیشترین مقاومت باکتری جدا شده از نمونه‌های بالینی به ترتیب در برابر آنتـی-بیوتیک‌های پنی سیلین (۱۰۰درصد) بـه دلیـل تولیـد آنـزیم بتالاکتاماز و بعد اگزاسیلین (۴۴/۷ درصد) بـود. همچنـین در این تحقیق، به روش PCR چون بـا یـک پرایمـر *VanA* انجـام شد، هیچ یک از نمونه‌های مقاوم بـه ونکومایسـین دارای بانـد مربوط به ژن *VanA* نبودند. احتمالا مقاومت بـه ونکومایسـین مربوط به ژن‌های دیگر مانند *VanB* است. در مطالعه فرهادیان و همکـارانش (۱۳۸۷-۱۳۸۶) از هفـت شـهر ایـران، PCR بـا پرایمرهـای خـاص بـرای شناسـایی ژن‌هـای *VanA*، *VanB* و*MecA* به کار برده شد. هیچ یک از سویه‌ها دارای باند مربوط به *VanA* نبودند (۲۳) که با مطالعه ما مشابهت دارد.

مطالعـات نشـان داده‌انـد کـه عـدم موفقیـت در درمـان بـا ونکومایسین باعث بوجود آمدن سویه‌های *hvisa* می‌شـود. بـا توجه به نتایج حاصـل از ایـن مطالعـه و مقایسـه آن بـا سـایر مطالعات مشابه، مشاهده می شود که فراوانی و شیوع مقاومـت آنتی بیوتیکی با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت است. لـذا شاید این دلیلی برای تفاوت بین نتایج حاصل از این مطالعـه و مطالعات فوق باشد. همچنین می‌تواند مرتبط با میزان مصـرف آنتی‌بیوتیک در این مناطق، بروز مکانیسم‌های مختلف مقاومت و انتشار کلون‌های مقاوم تحت فشـار مصـرف آنتـی بیـوتیکی باشـد. همچنـین ایـن مسـئله مـی‌توانـد مربـوط بـه پیـدایش موتاسیون در ژن مقاومت به ونکومایسین در بین این سویه‌هـا با وجود تفاوت‌های فیزیولوژیکی مانند تغییر در دیواره باکتری باشد. تحقیقات نشان می‌دهند دلایل تفـاوت‌هـای موجـود در نتایج بررسی‌های فنوتیپی و ژنـوتیپی بسـیار متنـوع هسـتند. روش‌های فنوتیپی تحت تاثیرعوامل محیطی هستند و برخی از استافیلوکوکوس‌ها فاقد ژن مقاومت بـه ونکومایسـین هسـتند، ولی به دلیل ترشح زیاد بتالاکتاماز در محیط کشت به صـورت کاذب به عنوان سویه‌های مقاوم شناسایی می‌شوند. شناسـایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین گاهی اوقات بـه دلیـل بیـان نـاهمگن مقاومـت پیچیـده اسـت و تاثیرپـذیر از متغیرهایی مانند دما pH و غلظت نمک است (۲۴). در میـان سویه‌هایی که با روش فنوتیپی مقاوم به ونکومایسین هسـتند، در روش مولکولی هیچ کدام ار سویه‌ها حاوی ژن *VanA* نبودند. این تفاوت‌ها ناشی از توزیع متفـاوت ایـن ژن در مکانهـای گونـاگون، روش‌های بیان آنها و یا به دلیل وجود ژن‌های دیگر است. حضور ژن مقاومت در میکروارگانیسم نشـان دهنـده فنوتیـپ مقاومـت نیست. درحقیقت بیان ژن مقاومت تحت کنترل شرایط مختلـف محیطی و احتمالاً ژن‌های دیگری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقاتی، حاصل پایان نامه دانشـجویی کارشناسـی ارشد میکـروب شناسـی اسـت. نویسـندگان مقالـه از معاونـت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بـه خاطر همکاری، نهایت تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Silva EC, Antas Md, Monteiro B Neto A, Rabelo MA, Melo FL, Maciel MA. Prevalence and risk factors for Staphylococcus aureus in health care workers at a university hospital of Recife-PE. Braz J Infect Dis 2008;12:504-8.
2. Cupane L, Pugacova N, Berzina D, Cauce V, Gardovska D, Miklasevics E. Patients with Panton- Valentine leukocidin positive Staphylococcus aureus infections run an increased risk of longer hospitalization. Int J Mol Epidemiol Genet 2012;3:48-55.
3. Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. J Clin Microbiol 2011;49:111-7.
4. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997;10:505-20.
5. Woo P, Lau SK, Wong SS, Yuen KY.Staphylococcus *aureus* subcutaneous abscess complicating acupuncture need for implementation of proper infection control guidelines. New Microbiol 2003;26:169-74.
6. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 2009;7:629-41.
7. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. Clin Infect Dis 2005;40:178- 91.
8. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of Vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992;93:195-8.
9. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005;40:562-73.
10. Mohanasoundaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Indian J Med Res 2008;127:78-84.
11. Méndez-Álvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. Int Microbiol 2010;3:71-80.
12. Muneeri SS, Mobaiyen H, Mirzaie H. Study on Vancomycin-resistant staphylococcus aureus and identification of VanA gene in these strains isolated from Tabriz Shuhada Hospital using e-test and PCR methods. Life Sci J 2013;10:748-52.
13. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, Aubrey T, Gudiol C, Riedel E, et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. Biol Blood Marrow Transplant 2007;13:615-21.
14. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycinresistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med 2003;348:1342-7.
15. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. The VanA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. Mol Gen Genet 1990;224:364-72.
16. Moza B, Varma AK, Buonpane RA, Zhu P, Herfst CA, Nicholson MJ, et al. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. EMBO J 2007;26:1187-97.
17. Mohajeri P, Izadi B, Rezaei M, Falahi B, Moradi Z, Zare ME. Study of nasal carriage Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hemodialysis patients in Kermanshah. J Kermanshah Univ Med Sci 2012;15:485-92.
18. Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and Characterization of a vancomycin resistant staphylococcus aureus isolated from Kolkata (South Asia). J Med Microbiol 2008;57:79-2.
19. Safdari H, Sadeghian A. Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, the most common antibiotics Ghaem Hospital in Mashhad in year 1390. 1390;1:43-6.
20. Ahmadishoar SH, Nahaei MR, Amirmozafari N. Sensitivity of strains isolated from clinical specimens against vancomycin using E-test in tabriz. TUOMS 2008;30:17-23.
21. Nicoletti G, Schito G, Fadda G, Boros S, Nicolosi D, Marchese A, et al. Bactrial isolates from sever infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of Nation wide study in the hospital setting. J Chemother 2006;18:589-602.

22. Thati V, Shivannavar CT, Gaddad SM. Vancomycin resistance tertiary care hospitals in Hyderabad. Indian J Med Res 2011;134:704-8.

23. Farhadian A, Behzadian Nejad Q, Najar Peerayeh SH, Rahbar M, Vaziri F. etermination of vancomycin and methicillin Resistance in clinical Isolates of staphylococcus aureus in Iranian Hospitals. Br Microbiol Res J 2008;4:454-61.

24. Hiramatsu K, Suzuki E,Takayama H, Katayama Y, Yokota T. Role ofpenicillinase plasmids in310the stability of the mecA gene in methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:600-4.