

Determination of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of *tetK*, *ant(4)-Ia*, *vanA*, and *ermA* Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Clinical Samples in Shahrekord, (Iran).

Sedighe Kazemi¹, Elahe Tajbakhsh^{1*}

¹Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Coagulase-negative *Staphylococci* are one of the most important drug resistant pathogens in nosocomial infections. In this study, the antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical samples in Shaherkord, was investigated.

Methods: In this cross-sectional descriptive study, antibiotic resistance of 80 isolates of *Staphylococcus epidermidis* to penicillin, ciprofloxacin, oxacillin, gentamicin, tetracycline, erythromycin, cotrimoxazole, rifampicin, ceftazidime, cefalotin, cloxacillin, vancomycin, cephalixin, and amoxiclav, was studied. The frequency of *tet K*, *ant (4) -Ia*, *vanA*, *ermA* genes, was investigated in the presence of specific primers.

Results: In this study, the highest resistance was to penicillin (93.8%) and the least resistance was to amoxiclav (1.25%). In the genotypic study, the frequency of *tetK*, *ant (4) -Ia*, *vanA*, *ermA* genes, was reported 66.66%, 80%, 50%, and 47.90, respectively.

Conclusion: Considering the comparison of different percentages of antibiogram results with similar tests, it should be taken into consideration that regional variation in different parts of the world leads to different therapeutic responses to antimicrobial drugs, which is due to genetic variation of individuals, genetic variation of strains, and variation in other fields. Accordingly, the therapeutic patterns used in different regions are different and defined by specific characteristics of each region.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*; Drug resistance, Microbial; Cross infection.

***Corresponding Author:**
Elahe Tajbakhsh,
Department of Microbiology,
Shahrekord Branch, Islamic
Azad University,
Shahrekord, Iran.

Email:
ee_tajbakhsh@yahoo.com

Received: 5 Apr, 2016

Accepted: 2 Sep, 2016

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی ژن‌های *ermA*، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد

صدیقه کاظمی^۱، الهه تاج‌بخش^{*}

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوک*‌های کوآگولاز منفی، یکی از عوامل مهم بیماریزای مقاوم به دارو در عفونت‌های بیمارستانی هستند. در این مطالعه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی - توصیفی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۸۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، اگزاسیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، ریفاپمپین، سفنازیدیم، سفالوتین، گلوکزاسیلین، ونکومایسین، سفالکسین و آموکسی‌کلاو مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژن‌های *ermA*، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* در حضور پرایمرهای اختصاصی بررسی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۳/۸٪) و کمترین مقاومت نسبت به آموکسی‌کلاو (۱/۲۵٪) بود. در بررسی ژنوتیپی، فراوانی ژن‌های *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* به ترتیب ۶۶/۶۶٪، ۸۰٪، ۵۰٪ و ۹۰/۴۷٪ گزارش شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقایسه درصدهای مختلف نتایج آنتی‌بیوگرام با آزمایشهای مشابه، باید توجه داشت تفاوت منطقه‌ای در نقاط مختلف دنیا، پاسخ‌های درمانی متفاوتی را نسبت به داروهای ضد میکروبی ایجاد می‌کند که ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تفاوت‌های ژنتیکی سویه‌ها و تفاوت در زمینه‌های دیگر است که بر این اساس، الگوهای درمانی مورد استفاده در نقاط مختلف، متفاوت و براساس ویژگی‌های خاص هر منطقه تعریف می‌شود.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ مقاومت دارویی میکروبی؛ انتشار عفونت.

گروه میکروب‌شناسی، واحد شهرکرد؛
دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

الهه تاج‌بخش، گروه میکروب‌شناسی،
واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی،
شهرکرد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

ee_tajbakhsh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Kazemi S, Tajbakhsh E. Determination of antibiotic resistance pattern and detection of *tetK*, *ant(4)-Ia*, *vanA*, and *ermA* Genes in *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in shahrekord (IRAN). *Qom Univ Med Sci J* 2017;11(8):57-65. [Full Text in Persian]

مقدمه

استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی به‌طور برجسته‌ای در طی دهه‌های گذشته، بیماریزا شده‌اند و دلیل آن، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان یا پیشگیری بوده است. استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی، جزء فلور طبیعی پوست هستند که می‌توانند در مخاط بینی و مجاری تنفسی، همچنین در تجهیزات پزشکی مستقر شوند و چسبیدن این باکتری‌ها به سطح کاترها، سایر تجهیزات مثل دریچه قلب و ایمپلنت‌های ارتوپدیک و توانایی بقای آنها بر روی مواد بیولوژیک، به‌عنوان اولین مرحله در عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها مطرح است (۱). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی، عمومی بوده و مربوط به مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیفی است که در بیمارستان مصرف می‌شوند. در سال ۱۹۴۴ اغلب استافیلوکوک‌ها در برابر پنی‌سیلین حساس بودند، اما چندی نگذشت که ۸۰-۶۵٪ استافیلوکوک‌های بیمارستانی به پنی‌سیلین مقاوم شدند و عرضه‌شدن پنی‌سیلین‌های مقاوم در برابر بتالاکتاماز سبب بهبودی موقت عفونت شد، اما گاهی عفونت‌های استافیلوکوکی مقاوم به متی‌سیلین، مشکل‌ساز می‌شود. ونکومایسین داروی اصلی برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکی مقاوم در برابر متی‌سیلین است، اخیراً سوش‌های مقاوم به ونکومایسین نیز گزارش شده است (۲). مقاومت به عوامل ضد میکروبی، یک مشکل فزاینده جهانی در سراسر دنیا، به‌ویژه در میان پاتوژن‌های بیمارستانی است (۳).

مقاومت علیه آنتی‌بیوتیک‌ها به‌وسیله مکانیسم‌های غیرژنتیکی (غیرفعال‌سازی آنزیماتیک دارو، تغییر سایت هدف ریبوزوم، کاهش نفوذپذیری و پس‌زدگی دارو) و مکانیسم‌های ژنتیکی (کونژوگاسیون، ترانسفورماسیون و ترانسداکسیون) ایجاد می‌شود. ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک شامل: *ermA* (اریترومایسین)، *vanA* (ونکومایسین)، *ant(4)-Ia* (جنتامایسین) و *tetK* (تتراسایکلین) در استافیلوکوک‌ها مشاهده شده که این ژن‌ها عملکردهای متفاوتی را انجام می‌دهند. ژن *tetK* موجب تغییر سایت هدف و یا افلوکس می‌شود (۴). آنزیم‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید،

(Amino Glycoside Modifying Enzymes, AMEs)

از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده مقاومت نسبت به

آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک‌ها هستند. تاکنون سه کلاس از این آنزیم‌ها شناسایی شده است: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز (Aminoglycoside Acetyl Transferases, AACs)، آمینوگلیکوزید فسفو ترانسفراز (Amino Glycoside Phospho Transferases, APH) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتید ترانسفراز (Amino Glycoside Nucleotidyl Transferases, ANT) (۵). از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک‌ها، غیرفعال‌سازی دارو به‌وسیله AMES بوده که مانند آمینوگلیکوزید نوکلئوتید ترانسفراز عمل می‌کند (۶، ۷). بنابراین، تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های استافیلوکوک به‌منظور استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان مؤثر ضروری است (۸).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها از جمله پنی‌سیلین، اگزاسیلین، اریترومایسین و ...، مقاومت دارد؛ لیکن فراوانی مقاومت در بین آنها بسیار متفاوت است. یافته‌های سایر پژوهشگران نیز مؤید این مطلب است، اگرچه در میزان شیوع مقاومت، در نتایج هریک با دیگری تفاوت‌هایی وجود دارد که احتمالاً می‌تواند ناشی از اختصاصات باکتری‌های بومی هر منطقه، تفاوت ماده اولیه و شرایط نگهداری آنتی‌بیوتیک‌ها و متدولوژی به کار گرفته شده باشد. انتخاب منطقی داروهای ضد میکروبی به تشخیص صحیح عامل بیماری‌زا و آنتی‌بیوگرام آن بستگی دارد (۲). این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله ژن‌های کدکننده مقاوم به اریترومایسین (*ermA*)، ونکومایسین (*vanA*)، جنتامایسین (*ant(4)-Ia*) و تتراسایکلین (*tetK*) با تکنیک PCR در ایزوله‌های استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس جدا شده از موارد کلینیکی در شهرکرد انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، طی مدت زمان ۶ ماه (فروردین‌ماه تا شهریورماه سال ۱۳۹۳) با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪، میزان خطای ۵٪ با استفاده از فرمول:

$$n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 p(1-p)}{d^2}$$

هر آنتی‌بیوتیک با دستورالعمل مربوطه به‌عنوان حساس و مقاوم ثبت گردید (۹۸). به‌منظور تأیید قطعی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در ایزوله‌های مورد بررسی، ردیابی ژن *16srRNA* در حضور زوج پرایمرهای نشان داده‌شده در جدول شماره ۱ انجام شد (۱۰).

برای ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل: ژن‌های *tetK* (کدکننده مقاومت به تتراسایکلین)، *ant(4)-Ia* (کدکننده مقاومت به جنتامایسین)، *vanA* (کدکننده مقاومت به ونکومایسین) و *ermA* (کدکننده مقاومت به اریترومایسین)، از زوج پرایمرهای ارائه‌شده در جدول شماره ۱ استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentase, Lithuania) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد و بسته به اندازه قطعات ژنی، آزمایش PCR روی نمونه‌های DNA انجام گرفت. واکنش PCR برای ژن‌های *16srRNA*، *tetK* و *ermA* به‌صورت جداگانه برای هر ژن، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلیمراز (Taq DNA Polymerase) (Fermentase Lithuania) و ۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه صورت گرفت.

ردیابی ژن‌های *vanA* و *ant(4)-Ia* / *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در یک واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰ برابر، ۱۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلیمراز، ۲ میکرولیتر DNA مربوط به هر نمونه صورت گرفت (۱۲، ۱۱). برای تکثیر قطعات ژنی مورد مطالعه از دستگاه Germany Eppendorf Master cycler Gradient استفاده شد. جهت ردیابی قطعه ژنی تکثیر یافته در PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل ۲٪ آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (Fermentase, Lithuania) صورت گرفت و پس از مشاهده ژل به‌دست آمده با دستگاه تراس لومیناتور (Uviteck, England)، تصویر به‌دست آمده روی کاغذ حرارتی ثبت گردید.

تعداد ۳۴۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها شامل ادرار (۱۵۰ نمونه)، خون (۹۰ نمونه)، کیسه دیالیز (۵۰ نمونه) و زخم (۵۰ نمونه) از بیمارستان‌های هاجر و کاشانی شهرکرد، به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی ژن‌های *ermA*، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* بلادآگار (Merck Germany) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری از نظر رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قندهای گزیلوز، ساکارز، ترهالوز، مالتوز، مانیتول، همولایزین و حساسیت نسبت به نوویوسین بررسی شدند. ایزوله‌هایی با رنگدانه سفید، واکنش رنگ‌آمیزی گرم مثبت، حساس نسبت به نوویوسین، مثبت بودن تست کاتالاز، منفی بودن تست کوآگولاز، توانایی تخمیر قندهای ساکارز، مالتوز و عدم توانایی تخمیر قندهای گزیلوز و ترهالوز به‌عنوان *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جداسازی شدند. *استافیلوکوکوس* همومینیس قادر به تخمیر قندهای ترهالوز، ساکارز و مالتوز است و قادر به تولید همولیز نمی‌باشد (۷). در این تحقیق از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC1435 تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی به‌عنوان سویه استاندارد استفاده شد. به‌منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، از روش کربی-بائر (انتشار دیسک) طبق دستورالعمل CLSI استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل: پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۲۵ میکروگرم)، ریفامپین (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، گلوکزاسیلین (۵ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی‌کلاو (۳۰ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) (شرکت پادتن طب) بود.

در این روش، سوپانسیون باکتری با کدورت معادل ۵/۰ مک‌فارلند بر روی محیط مولر هیتون آگار (Hi Media India) تلقیح شد. پس از گذاشتن دیسک‌ها در محیط کشت و ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد برای

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و برنامه دمایی جهت ردیابی ژن *16srRNA* و ژن‌های *ermA*، *vanA*، *ant(4)-Ia*، *tetK* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس*

اندازه محصول	دمای انلینگ	توالی پرایمر	ژن
۷۹۱	۶۶	F: CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R: CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCG	<i>16srRNA</i>
۱۳۵	۵۰	F: AATCGGTAGAAGCCCAA R: GCACCTGCCATTGCTA	<i>ant(4)-Ia</i>
۴۷۴	۵۰	F: ATGAATAGAATAAAAGTTGC R: TCACCCCTTTACGCTAATA	<i>van A</i>
۳۶۰	۵۶	F: GTAGCGACAATAGGTAATAGT R: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	<i>tet K</i>
۴۳۴	۵۱	F: GCGGTAAACCCCTCTGAG R: GCCTGTCGGAATTGG	<i>erm A</i>

مربوط به نمونه‌های اخذ شده از زخم (۱۲٪) بود. آلودگی به *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس* در نمونه‌های خون، ۲۲/۳۳٪ و در کیسه دیالیز، ۲۶٪ گزارش شد. ۸۰ نمونه مورد بررسی پس از تشخیص قطعی در حضور پرایمر اختصاصی ژن *16srRNA* به منظور تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در حضور آنتی‌بیوتیک‌های شایع به روش کربی-بائر بررسی شدند. نتایج مربوط به انجام تست آنتی‌بیوگرام در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و آزمون دقیق فشر، در سطح اطمینان ۹۵٪ تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این تحقیق از مجموع ۳۴۰ نمونه عفونت بیمارستانی، تعداد ۸۰ نمونه (۲۳/۵۲٪) از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس*، مثبت تشخیص داده شدند که بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه‌های اخذ شده از ادرار (۲۶/۶۶٪) و کمترین میزان آلودگی

جدول شماره ۲: تعداد و درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ۸۰ ایزوله *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس* جدا شده از موارد کلینیکی

ردیف	آنتی‌بیوتیک	مقاوم	حد واسط	حساس
۱	پنی‌سیلین	۹۳/۸ (۷۵)	۰ (۰)	۶/۲ (۵)
۲	اگزاسیلین	۸۱/۲۵ (۲۵)	۶/۲۵ (۵)	۱۳/۵ (۱۰)
۳	کوتریموکسازول	۵۶/۲۵ (۴۵)	۲۵ (۲۰)	۱۷/۸ (۱۵)
۴	تراسایکلین	۵۶/۲۵ (۴۵)	۶/۲۵ (۵)	۳۷/۵ (۳۰)
۵	اریترومایسین	۵۲/۵ (۴۲)	۱۲/۵ (۱۰)	۳۵ (۲۸)
۶	کلوزاکسازول	۳۵ (۲۸)	۱۰ (۸)	۵۵ (۴۴)
۷	سیپروفلوکساسین	۳۲/۵ (۲۶)	۱۲/۵ (۱۰)	۵۵ (۴۴)
۸	جنتامایسین	۳۱/۲۵ (۲۵)	۱۸/۷۵ (۱۵)	۵۰ (۴۰)
۹	سفتازیدیم	۱۵ (۱۲)	۲۵ (۲۰)	۶۰ (۴۸)
۱۰	سفالوتین	۱۲/۵ (۱۰)	۳۱/۲۵ (۲۵)	۵۶/۲ (۴۵)
۱۱	آموکسی‌کلاو	۱/۲۵ (۹)	۱۲/۵ (۱۰)	۷۶/۲ (۶۱)
۱۲	ریفامپین	۶/۲۵ (۵)	۶/۲۵ (۵)	۸۷/۵ (۷۰)
۱۳	سفالکسین	۶/۲۵ (۵)	۱۲/۵ (۱۰)	۸۱/۲ (۶۵)
۱۴	ونکومایسین	۲/۵ (۲)	۰ (۰)	۹۷/۵ (۷۸)

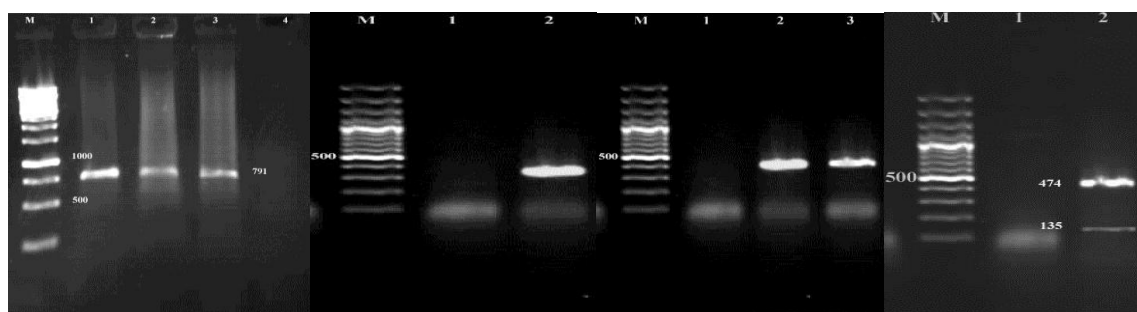
در بخش ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ فراوانی ژن *tetK*، ۶۶/۶۶٪ گزارش شد که مشاهده باند ۳۶۰ جفت بازی، نشان‌دهنده مثبت بودن این تست بود (نتایج در شکل شماره ۲ آورده شده است).

از ۸۰ ایزوله مورد بررسی در این تحقیق، ۵۱ نمونه (۶۳/۷۵٪) مربوط به جنسیت زن و ۲۹ نمونه (۳۶/۲۵٪) مربوط به جنسیت مرد بود. در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کای‌دو، بین آلودگی به *استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس* و جنسیت، رابطه معنی‌دار آماری مشاهده گردید ($p < 0.01$).

فراوانی ژن *ermA* ۹۰/۴۷٪ گزارش شد که مشاهده باند ۴۳۴ جفت بازی، نشان‌دهنده مثبت بودن این تست می‌باشد (نتایج در شکل شماره ۳ ارائه شده است).
 در ایزوله‌های مقاوم به جنتامایسین؛ فراوانی ژن *ant(4)-Ia* ۸۰٪ و فراوانی ژن *vanA* ۵۰٪ گزارش شد.

جدول شماره ۳: نتایج مربوط به ردیابی ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

نوع ژن	آنتی‌بیوتیک	مقاومت با دیسک	مقاومت به روش تشخیص مولکولی
<i>tet K</i>	تتراسایکلین	۴۵ (٪۵۶/۲۵)	۳۰ (٪۶۶/۶۶)
<i>-Ia ant(4)</i>	جنتامایسین	۲۵ (٪۳۱/۲۵)	۲۰ (٪۸۰)
<i>vanA</i>	ونکومایسین	۲ (٪۲/۵)	۱ (٪۵۰)
<i>ermA</i>	اریترومایسین	۴۲ (٪۵۲/۵)	۳۸ (٪۹۰/۴۷)



شکل شماره ۲

شکل شماره ۳

شکل شماره ۴

شکل شماره ۱

شکل شماره ۱: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *16SrRNA* / *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ ستون M: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمتاز؛ ستون ۱: کنترل مثبت (سویه PTCC1435)؛ ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت مورد بررسی واجد باند ۷۹۱ جفت بازی؛ ستون ۴: کنترل منفی.
 شکل شماره ۲: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *tetK* / *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز؛ ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲ نمونه واجد باند ۳۶۰ جفت بازی.

شکل شماره ۳: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *ermA* / *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز؛ ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت مورد بررسی واجد باند ۴۳۴ جفت بازی.

شکل شماره ۴: ژل الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *ant(4)-Ia* و *vanA* / *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز؛ ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲: باند ۱۳۵ جفت بازی مربوط به ژن *ant(4)-Ia* و باند ۴۷۴ جفت بازی مربوط به ژن *vanA*.

ساپروفیت معرفی می‌شد، ولی در طی دهه‌های اخیر با گسترش استفاده از وسایل پزشکی تعبیه‌شونده در بدن نظیر انواع سوندها و پروتزها به‌عنوان یک پاتوژن مهم بیمارستانی ظهور کرده است. در دهه گذشته، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به‌عنوان یکی از عوامل عفونت بیمارستانی و یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت خون، مطرح و شناخته شده است (۱۳). همچنین این باکتری از عفونت‌های ادرار، زخم، اندوکاردیت، باکتری، پنومونی، عفونت‌های پوستی و بافت نرم جدا شده است (۱۴، ۹). امروزه، بیشترین تمرکز در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی باکتری‌هایی است که از نمونه‌های بالینی (پزشکی و دامپزشکی) جدا می‌شوند.

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن *tetK* رابطه معنی‌داری مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$).

بحث

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، مهم‌ترین عضو گروه *استافیلوکوک*‌های کوآگولاز منفی و عامل ۷۵٪ از عفونت‌های این گروه می‌باشد. این میکروارگانیسم بخشی از میکروفلور طبیعی پوست انسان بوده و در مخاط بینی و بخش فوقانی مجاری تنفسی مستقر می‌باشد. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تا مدت‌ها به‌علت طبیعت همه‌جایی و بیماری‌زایی نسبتاً ضعیف، به‌عنوان

تحقیقات نشان می‌دهد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در همه جای طبیعت وجود دارند، به‌طوری‌که شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فاضلاب‌های مراکز پزشکی، صنعتی و مراکز پرورش حیوانات گزارش شده است (۱۹-۱۶).

در تحقیق حاضر، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۳/۸٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌کلاو (۱/۲۵٪) گزارش شد؛ درحالی‌که در تحقیق انجام‌شده توسط رحیمی و همکاران که بر روی ۱۹۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین جداشده از نمونه‌های بالینی در تهران صورت گرفت، ۷۲ سویه (۳۷/۳٪) به‌عنوان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شدند که تمامی آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین مقاوم بودند. همچنین بالاترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، تتراسایکلین و آمیکاسین مشاهده گردید. همچنین حدود ۹۵٪ از سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین، فوزیدیک اسید و ونکومایسین حساسیت نشان دادند. در این تحقیق مشابه مطالعه حاضر، بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین و کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین مشاهده شد (۲۰). در تحقیق انجام‌شده دیگری توسط صدیقیان و همکاران بر روی ۶۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*؛ مقاومت این باکتری نسبت به گلوکزاسیلین (۱۲/۵٪)، کلیندامایسین (۲۶/۲٪)، کوتریموکسازول (۵۳٪)، ونکومایسین (۶/۷٪)، جنتامایسین (۲۵٪)، پنی‌سیلین (۸۲/۱٪)، سیپروفلوکساسین (۲۵/۴٪)، آمپی‌سیلین (۵۲/۹٪)، آمپی‌سیلین سولباکتام (۸/۳٪)، سفتریوکسیم (۲۵٪)، سفتریاکسون (۱۱/۱٪)، اگزاسیلین (۸۹/۲٪)، تتراسایکلین (۵۲/۹٪)، اریترومایسین (۵۴٪)، توبرامایسین (۳۴/۴٪) گزارش شد که مقاومت نسبت به پنی‌سیلین، اگزاسیلین، کوتریموکسازول، تتراسایکلین، جنتامایسین و اریترومایسین تقریباً با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی داشت. در هر دو مطالعه، کمترین مقاومت نسبت به ونکومایسین مشاهده شد (۲۱). در تحقیق انجام‌شده توسط اسلامی و همکاران، از مجموع ۱۰۰ ارگانیزم جداشده از ضایعات پستی در بررسی

آنتی‌بیوگرام؛ بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی نسبت به پنی‌سیلین (۹۳٪)، آموکسی‌سیلین (۸۷/۳٪) و اگزاسیلین (۸۰/۴٪) و بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ونکومایسین به میزان ۹۵٪ گزارش شد (۲۲). مقاومت در برابر چندین آنتی‌بیوتیک، یکی از خصوصیات اصلی استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی است. الگوی واحدی برای بروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها وجود ندارد. مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک نه تنها سبب مشکلاتی در درمان سپتیسمی‌ها می‌شود؛ بلکه احتمال انتقال ژن‌های مقاوم به *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز وجود دارد.

در برخی از بیمارستان‌ها، *استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی* به کوتریموکسازول و جنتامایسین مقاومت زیادی دارند، اما در مناطق دیگر حساس هستند؛ به‌طوری‌که در تحقیق حاضر مقاومت نسبت به کوتریموکسازول، ۵۳٪ و مقاومت نسبت به جنتامایسین، ۲۵٪ گزارش شد. امروزه به‌علت مصرف بی‌رویه و خودسرانه آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول در موارد عفونت‌های انسانی و انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به باکتری‌های حساس، موفقیت درمان با این آنتی‌بیوتیک در بیماران (مبتلا به عفونت‌های مجاری ادراری) رو به کاهش است.

سویه‌های مقاوم، توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را به‌وسیله آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides Modifying Enzymes) AME دارا هستند. مقاومت نسبت به کانامایسین و توبرامایسین از طریق ژن *ant(2'')-Ia* و مقاومت نسبت به جنتامایسین از طریق ژن *aac(3)-IIa* صورت می‌گیرد. در تحقیق انجام‌شده توسط سلیمانی و همکاران، شیوع ژن‌های *ant(2'')-Ia* و *aac(3)-IIa* در ایزوله‌های *شرشیاکلی* (عامل عفونت ادراری) به ترتیب ۸۷/۷۸٪ و ۸۸/۴۷٪ گزارش شد (۲۳). Scheel و همکاران گزارش کردند سپتیسمی ناشی از *استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی* از سال ۱۹۸۹-۱۹۸۵ به میزان ۳۹٪ افزایش یافته است (۲۴). در تحقیق حاضر، تتراسایکلین آنتی‌بیوتیکی بود که در بین ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، مقاومت بالایی نسبت به آن گزارش شد. این آنتی‌بیوتیک به دلیل قیمت پایین و کم بودن اثرات جانبی آن، کاربرد وسیعی در درمان عفونت‌های دامی و انسانی دارد.

طراحی شده، منطقه جغرافیایی و شرایط آب و هوایی منطقه، اولویت در تجویز آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط پزشکان منطقه و در دسترس بودن آنتی‌بیوتیک‌های مختلف باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مشاهده روزافزون مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، تغییرات گسترده طیف اثربخشی نسبت به داروها و جلوگیری از افزایش ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، انجام آزمون‌های حساسیت دارویی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، همچنین درصد بالای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در افراد مورد مطالعه می‌تواند نشان‌دهنده مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. با توجه به افزایش شیوع ایزوله‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها؛ تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم، به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت، امری ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان صمیمانه از زحمات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد و جناب آقای مهندس منوچهر مؤمنی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

در صنعت دامداری از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به عنوان پروموتور رشد آنتی‌بیوتیکی استفاده زیادی می‌شود که یکی از این پروموتورهای رشد، تتراسایکلین است. استفاده بیش از حد و کنترل نشده از این آنتی‌بیوتیک در دام‌ها باعث افزایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به آن شده است. مقاومت به تتراسایکلین، مربوط به ژن‌های *tet* می‌باشد. پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها از عوامل اصلی گسترش سریع ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در میان سویه‌های باکتریایی هستند (۲۵). در تحقیق حاضر، از ۴۵ ایزوله که مقاومت به تتراسایکلین در آنها گزارش شد، ۳۰ ایزوله (۶۶/۶۶٪) حاوی ژن *tetK* بود. وجود ارتباط معنی‌دار بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن *tetK*، حاکی از انتقال مقاومت به تتراسایکلین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از طریق این ژن می‌باشد.

در مطالعه دیگر انجام شده توسط Zmantar و همکاران بر روی ۱۱۷ ایزوله *استافیلوکوکوس* (۴۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۷۱ ایزوله *استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی*) از ۴۶ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*، فراوانی ژن‌های *ermA*، *ermB* و *ermC* به ترتیب ۷/۷٪، ۱۳/۷٪ و ۶٪ گزارش شد و از ۷۱ ایزوله *استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی*، فراوانی ژن‌های *ermB*، *ermA* و *ermC* به ترتیب ۹/۴٪، ۱۱/۱٪ و ۰/۴٪ بود (۲۶). تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه با سایر مطالعات می‌تواند مربوط به تفاوت در نوع نمونه بالینی اخذ شده، تعداد نمونه‌های مورد بررسی، روش نمونه‌گیری، نوع مطالعه

References:

- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jaris WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States. *Am J Med* 1991;91(38):86-89.
- Louie L, Majury A, Goodfellow J, Louie M, Simor AE. Evaluation of latex agglutination test for detection of oxacillin resistance in coagulase negative Staphylococci. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):4149-51.
- Livermore DM. Antibiotic resistance in Staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16 Suppl 1:S3-10.
- Reisi M, Tajbakhsh E, Momtaz H. Isolation and identification of antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus isolates from respiratory system infections in Shahrekord, Iran. *Biol J Micro* 2014;3(10):97-106. [Full Text in Persian]
- Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. *J Korean Med Sci* 2003;18(5):631-6.
- Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 2009;15(2):109-13.

7. Cunha Mde L, Sinzato YK, Silveira LV. Comparison of methods for the identification of coagulase negative Staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004;99(8):855-60.
8. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 2009;49(11):1749-55.
9. Wayne PA. CLSI document M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-first informational Supplements. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
10. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Oiha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR Protocol for the diagnosis of Staphylococcal infection. J Clin Microbiol 2001;39(9):3332-38.
11. Werckenthin C, Schwarz S. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed erm A gene from Staphylococcus intermedius. J Antimicrob Chemother 2000;46(5):785-8.
12. Chakraborty SP, Kar Mahapatra S, Bal M, Roy S. Isolation and Identification of vancomycin Resistant Staphylococcus aureus from Post operative pus sample. Al Ameen J Med Sci 2011;4(2):152-68.
13. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006;24(1):25-26.
14. Mendes RE, Reis AO, Gales AC; Jones RN, Sader HS. Ability of Latin America laboratories to detect antimicrobial resistance patterns: Experience of the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). Braz J Infect Dis 2003; 282-9.
15. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall ABA, Hawkey PM, Wellington EMH. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2):696-702.
16. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol 2003;43(3):325-35.
17. Kümmerer K. Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother 2004;54(3):311-20.
18. Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in municipal wastewater using real time PCR (TaqMan). J Microbiol Methods 2004;56(2):277-86.
19. Czekalski N, Berthold T, Caucci S, Egli A, Bürgmann H. Increased levels of multi resistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland A. Front Microbiol 2012 22;3:106.
20. Rahimi F, Arabestani M, Karimi SH. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant staphylococcus epidermidis isolated from clinical samples in Tehran. Iranian J Infect Dis 2013;63:37-42. [Full Text in Persian]
21. Sedighian F, Saneei A, Allaodoleheei H, Arshi M, Rekabpour KH. Antibiotic resistant microorganisms isolated in Babol Yahyanejad Hospital in 2006. Med Lab J 2008;4(2):94-99. [Full Text in Persian]
22. Eslami G, Khoshro F, Taheri S, Samad R, Baseri N, Azargashb E. Prevalence of bacterial agents in patients with conjunctivitis infection in Farabi hospital, Tehran. Res Med 2013;36(4):189-92. [Full Text in Persian]
23. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic E. coli isolated from Iranian hospital. BMC Res Notes 2014;7:842.
24. Alborzi A, PourabbasB, Salehi H, Oboodi B, Panjeshin MR. Prevalence and pattern of antibiotic sensitivity of methicillin sensitive and methicillin resistant Staphylococcus aureus in Shiraz-Iran. Iranian J Med Sci 2000;25(1-2):1-8. [Full Text in Persian]
25. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical Escherichia coli strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol 2004;70(4):2503-7.
26. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococci. BMC Res Notes 2011;4(453):2-9.