

بررسی نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلیم در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين

فاتح رحیمی^{۱*}، ساناز خاشعی^۲

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان

۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

پذیرش برای چاپ: بهار ۱۴۰۴

دریافت مقاله: زمستان ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلیم دو مشکل اصلی در کنترل عفونتهای ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشند. این پژوهش با هدف بررسی ویژگی های ژنتیکی مؤثر بر مقاومت آنتی بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلیم در سویه های مقاوم به متی سیلین (MRSA) و ونکومايسين (VRSA) انجام شد.

روش کار: در سالهای ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۳، ۸۵۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیماران بستری در یک بیمارستان مرجع در تهران، جمع آوری شد. شناسایی سویه های MRSA و VRSA با غربالگری ژلوز، broth microdilution و PCR ژنهای *mecA/mecC* و *vanA-vanG* انجام گرفت. حساسیت به ۱۵ آنتی بیوتیک براساس دستورالعمل CLSI بررسی و توانایی تشکیل بیوفیلیم با آزمونهای ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت سنجیده شد. پروفایل ژنتیکی با بررسی شیوع تایپهای *SCCmec*، پروفاز و *agr* و ژنهای *icaADBC* و *bap* تعیین شد.

یافته ها: بیست و سه درصد از ایزوله ها به عنوان MRSA شناسایی شدند که از میان آنها ۵ سویه (۳ درصد) مقاوم به ونکومايسين (VRSA) بودند. تمامی سویه ها به پنی سیلین G مقاوم و به کلرامفنیکل، کینوپریستین-دالفوپریستین و لینزولاید حساس بودند. ۹۸ درصد از سویه های MRSA و تمامی سویه های VRSA مولد بیوفیلیم بودند. اپرون *icaADBC* در ۹۲ درصد از سویه های مولد بیوفیلیم شناسایی و ژن *bap* در هیچ سویه ای یافت نشد. براساس نتایج *SCCmec* تایپینگ، ۸۶ درصد از سویه های MRSA اکتسابی از بیمارستان بودند. از سوی دیگر، پروفاز تایپ *SGA* تنها در سویه های اکتسابی از جامعه، شناسایی شد و سویه های بیمارستانی هیچکدام واجد این پروفاز تایپ نبودند. *agr* تایپ I در سویه های MRSA (۵۲ درصد) و تایپ II در سویه های VRSA (۶۰ درصد) غالب بود.

نتیجه گیری: شیوع سویه های MRSA و VRSA با توان بالای تشکیل بیوفیلیم و واجد انواع مختلف پروفاز تایپها با پتانسیل بیماریزایی بالا در بیماران مبتلا به عفونتهای مختلف در تهران نشان دهنده نیاز به تقویت اقدامات کنترل عفونت می باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت به متی سیلین، مقاومت به ونکومايسين، بیوفیلیم، تایپینگ مولکولی

مقدمه

پوست و غشاهای نازوفارنکس خود هستند (۱). این باکتری به دلیل وجود عوامل حدت متعدد، توانایی تشکیل بیوفیلیم و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده یکی از عوامل بسیار مهم در ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها از جمله عفونتهای نسبتاً خوش خیم پوست و بافت نرم تا بیماریهای سیستمیک

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل قدرت انطباق پذیری متابولیکی بالا به عنوان یکی میکروارگانیسم ساکن و عضوی از میکروبیوتای طبیعی در حفره بینی، پوست، روده، مقعد و واژن شناخته می شود به گونه ای که تقریباً ۲۵ تا ۳۰ درصد از افراد سالم واجد *استافیلوکوکوس اورئوس* کلنیزه شده بر روی

باعث تبدیل D-ala-D-ala به D-ala-D-lac و D-ala-D-ser در زنجیره پنتا-پپتیدی ساختار پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت (انتروکوکها، استافیلوکوکها، لیستریا، کورینه باکتریوم و کلاستریدومها) و در نهایت ایجاد مقاومت سویه ها نسبت به ونکومايسين و ساير آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی می شوند. ژنوتایپهای *vanA*، *vanB*، *vanD*، *vanF*، *vanI* و *vanM* (رمز کننده آنزیم لیگاز D-ala-D-lac) و ژنوتایپهای *vanC*، *vanE*، *vanG*، *vanL* و *vanN* (رمز کننده آنزیم لیگاز D-ala-D-lac) به ترتیب باعث ایجاد مقاومتهای سطح بالا ($MIC \geq 256$) و سطح پایین ($MIC \geq 16 \mu g/ml$) نسبت به ونکومايسين می شوند (۱).

علاوه بر مقاومت ضد میکروبی، سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی سیلین قادر به تشکیل بیوفیلم هستند که باعث چسبندگی قوی باکتریها به سطوح و به یکدیگر و همچنین افزایش مقاومت دارویی و در نتیجه کاهش اثربخشی ترکیبات ضد میکروبی می شود (۱۵). با تشکیل بیوفیلم، مقاومت استافیلوکوکوس / اورئوس در برابر آنتی بیوتیکها تا ۱۰۰۰ برابر نسبت به حالت پلانکتونی افزایش پیدا می کند (۱۶). بنابراین، تشکیل بیوفیلم توسط سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومايسين یک سازوکار مهم برای بقا و انتشار در محیطهای بیمارستانی و جامعه محسوب می شود (۱۷). با توجه به اهمیت بررسی ویژگیهای سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين و تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی، توانایی تشکیل بیوفیلم و همچنین ژنوتایپهای مقاوم به این آنتی بیوتیکها، این مطالعه به مدت دو سال بر روی سویه های مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين جداسازی شده از بیماران بستری در یک بیمارستان مرجع دانشگاهی در شهر تهران به انجام رسیده است.

مواد و روشها

جمع آوری و شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس / اورئوس

در یک مطالعه ۲ ساله از خرداد ۱۴۰۱ لغایت اردیبهشت ۱۴۰۳ در مجموع ۸۵۹ ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس / اورئوس از بیماران بستری در یک بیمارستان دانشگاهی مرجع در شهر تهران جمع آوری شد. تمامی ایزوله های توسط پرسنل آزمایشگاه بیمارستان از بیماران جداسازی شده بودند و

شدید و کشنده می شود (۴-۲). ظهور و انتشار سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و همچنین واجد مقاومت آنتی بیوتیکی چندانکه یک مسئله چالش برانگیز در بهداشت عمومی است که منجر به بستری طولانی مدت در بیمارستان و استفاده از نسلهای جدیدتر آنتی بیوتیکها و طبیعتا افزایش هزینه های درمانی می شود (۱، ۵). متی سیلین از جمله آنتی بیوتیکهای نیمه سنتتیک از خانواده بتا-لاکتام مؤثر بر سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به پنی سیلین می باشد که سالها برای درمان عفونتهای ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار گرفته است؛ اما امروزه به دلیل شیوع گسترده سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی سیلین (methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)) در بیمارستانها و جامعه کارآیی و اثربخشی خود را برای این سویه ها از دست داده است (۶، ۷). مقاومت به متی سیلین از طریق ژنهای *mecA* یا *mecC* ایجاد می شود که بر روی کاست کروموزومی استافیلوکوک (staphylococcal cassette chromosome (SCC)) قرار داشته و پروتئین 2A متصل شونده به پنی سیلین (PBP2A) یا PBP2A_{ALGA} را رمز می کنند که باعث کاهش میل ترکیبی نسبت به آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام و در نتیجه منجر به مقاومت نسبت به آنها می شوند (۸-۱۰).

از این رو، گسترش مقاومت به متی سیلین در سویه های استافیلوکوکوس / اورئوس پزشکان را ناچار به استفاده از آنتی بیوتیکهای دیگر از جمله ونکومايسين کرده است، که مصرف بی رویه و فراوان باعث افزایش فشار انتخابی برای ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک نیز شده است (۱۱). ونکومايسين در حدود ۶۰ سال یکی از داروهای خط اول درمان عفونتهای مرتبط با استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به متی سیلین بوده است (۱، ۱۲). با این حال، ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس / اورئوس مقاوم به ونکومايسين (*vancomycin resistant S. aureus* (VRSA)) و یا واجد مقاومت کاهش یافته نسبت به ونکومايسين (*vancomycin intermediate S. aureus* (VISA)) در دو دهه گذشته در کشورهای مختلف ظهور کرده و به یک نگرانی جدی در سلامت و بهداشت عمومی جوامع مبدل شده اند (۱۳، ۱۴). ونکومايسين از جمله آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی است که مقاومت نسبت به آن ناشی از وجود ۱۱ ژنوتایپ مختلف (*vanA*، *vanB*، *vanC*، *vanD*، *vanE*، *vanF*، *vanG*، *vanI*، *vanL*، *vanM* و *vanN*) است که

آنتی بیوتیکی (Liofilchem, Italy) شامل آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کینوپریستین-دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، لوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، لینزولاید (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم) به روش انتشار دیسک در محیط ژلوز مولر هینتون بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید (۱۸). همچنین، جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیکهای متی سیلین و ونکومایسین، روش broth microdilution با استفاده از محیط آگوش مولر هینتون (Scharlau, Spain) و پودرهای آنتی بیوتیک اگزاسیلین و ونکومایسین (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) در اساس توصیه های CLSI مورد استفاده قرار گرفت (۱۸).

روشهای مولکولی

استخراج DNA

برای استخراج DNA از تمامی ایزوله های باکتریایی جمع آوری شده و منتخب از روش جوشاندن بر اساس پروتکل پیشین رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۹). به صورت خلاصه، پس از تهیه کشت خطی تازه از هر ایزوله باکتریایی، یک لوپ پر از هر باکتری به ویال محتوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل و پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (NP-1000، شرکت پدیده نوژن پارس، مشهد، ایران) در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از آن ویالهای جوشانده شده به مدت ۱۵ دقیقه در $13000 \times g$ سانتریفیوژ (ارمغان طب ایرانیان، تهران، ایران) شدند و از مایع رویی آن به عنوان الگوی DNA در تمامی آزمونهای PCR استفاده شد.

بررسی حضور ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومایسین

جهت تعیین حضور ژنهای *mecA* و *mecC* در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از دو آزمون PCR جداگانه با پرایمرهای اختصاصی هر ژن (جدول ضمیمه

جمع آوری پلیتهای کشت شده ایزوله ها به صورت هفتگی از آزمایشگاه بیمارستان مورد نظر انجام گرفت. تمامی ایزوله ها غیرتکراری بودند و هر ایزوله از یک بیمار جداسازی شده بود. تمامی پلیتها پس از جمع آوری به یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی خصوصی در شهر تهران منتقل شده و پس از کشت مجدد بر روی محیط ژلوز خوندار (HiMedia, Mumbai, India) و حصول اطمینان از خلوص ایزوله ها، یک کلنی از هر ایزوله به ویالهای کرایو واجد محیط آگوش تریپتیک سوی (tryptic soy broth (TSB)) (Merck, Darmstadt, Germany) و گلیسرول منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس ویالهای کرایو با رعایت زنجیره سرد و در کنار یخ به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شده و در آزمایشگاه پس از کشت خطی بر روی محیط ژلوز کلمبیا (Merck, Darmstadt, Germany) با استفاده از آزمون polymerase chain reaction (PCR) و با پرایمرهای اختصاصی ژن *nucA* (جدول ضمیمه ۱) بر اساس دستورالعمل پیشین مورد شناسایی قرار گرفتند (۴). پس از شناسایی و تأیید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، به منظور جداسازی سویه های مقاوم به متی سیلین و ونکومایسین از کشت سویه ها بر روی محیطهای ژلوز مولر هینتون (Scharlau, Spain) واجد به ترتیب ۶ میکروگرم/میلی لیتر اگزاسیلین و ۶ میکروگرم/میلی لیتر ونکومایسین (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) بر اساس توصیه های clinical and laboratory standards institute (CLSI) استفاده شد (۱۸). در نهایت پس از انتخاب سویه های مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومایسین سایر سویه ها از روند بررسی خارج شدند.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومایسین

پس از انتخاب سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومایسین به روش غربالگری ژلوز، در ابتدا مقاومت به متی سیلین در این سویه ها به روش انتشار دیسک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) در محیط ژلوز مولر هینتون (Scharlau, Spain) بر اساس دستورالعمل های CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). پس از تأیید سویه ها، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها نسبت به ۱۵ دیسک

(۱) بر اساس دستورالعمل و چرخه های حرارتی که پیشتر معرفی شده بودند، استفاده گردید (۴، ۲۰). همچنین، پس از شناسایی ژنهای مقاومت به متی سیلین در میان سویه ها، حضور SCCmec تایپهای مختلف (I-V) و تایپهای مختلف ccr (تایپهای ۵-۱) در این سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ضمیمه ۱) و دو آزمون multiplex-PCR مجزا بر اساس برنامه های مورد استفاده قبلی تعیین شدند (۳). علاوه بر این، برای تعیین ژنوتایپهای مقاومت به ونکومايسين (vanA-vanG) در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين و یا واجد مقاومت کاهش یافته نسبت به این آنتی بیوتیک از آزمونهای PCR و multiplex-PCR جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژنها (جدول ضمیمه ۱) و بر اساس برنامه های حرارتی پیشین استفاده شد (۲۱).

پروفاژ تایپینگ و agr تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين

در این مطالعه جهت بررسی حضور پروفاژ تایپهای مختلف در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين از آزمون multiplex-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژنهای مربوط به پروفاژ تایپهای SGB، SGA، SGF، SGFb، SGFa، SGD و SGL (جدول ضمیمه ۲) و شرایطی که که پیشتر معرفی شد، استفاده گردید (۲۲). همچنین، حضور چهار agr تایپ (I-IV) نیز در این سویه ها بر اساس آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی این ژنها (جدول ضمیمه ۲) با کمک پروتکل پیشین رحیمی و همکاران تعیین گردید (۳).

بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين

برای تعیین توانایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين در تشکیل بیوفیلم بر اساس پروتکل معرفی شده توسط رحیمی و همکاران دو آزمون فنوتیپی کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت مورد استفاده قرار گرفتند (۳). برای انجام آزمون کیفی، پس از تهیه محیط ژلوز قرمز کنگو یک کلنی از کشت خالص و تازه هر سویه باکتریایی بر روی محیط به صورت خطی کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد

و سپس ۲۴ ساعت نگهداری در دمای اتاق، کلنیهای حاصل بر روی محیط مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت سویه های باکتریایی بر اساس رنگ حاصل به سه مورفوتایپ اسلایم مثبت (رنگ مشکی)، اسلایم منفی (قرمز روشن) و اسلایم مشکوک (قرمز تیره) تقسیم بندی شدند. کلنیهای واجد مورفوتایپ اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک انتخاب شده و با آزمون کمی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون کمی ابتدا کشت هر سویه در محیط آبگوشت تریپتیک سوی (Scharlau, Spain) تلقیح شده با ۰/۲۵ درصد سوکروز تهیه شد و لوله های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس از آن کدورتی معادل 10^6 CFU/mL تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون در ۳ چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت، چاهکها تخلیه شده و با استفاده از بافر phosphate buffer saline (PBS) شست و شو داده شدند. پس از خشک شدن پلیتها، جهت رنگ آمیزی هر چاهک از کریستال ویوله (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) ۰/۳۶ درصد استفاده شد و پس از رنگ آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه مجدداً چاهکها همانند مرحله پیشین تخلیه و شست و شو شدند. در نهایت با استفاده از ترکیب اتانول-استن (۲۰-۸۰ درصد) رنگبری از چاهکها به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. برای تعیین جذب نوری هر چاهک، دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2000, Awareness Technologies, USA) و با طول موج ۵۷۰ نانومتر در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده تمامی سویه ها به ۴ دسته بیوفیلم قوی ($570 \geq 1$)، بیوفیلم منفی ($570 \leq ODc$)، بیوفیلم ضعیف ($570 < 0.2$) و بیوفیلم متوسط ($0.2 \leq OD570 < 1.0$) تقسیم بندی شدند.

بررسی ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم

جهت بررسی حضور ژنهای مربوط به اپرون *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* (۱۷) و همچنین ژن *bap* (۳) از آزمونهای multiplex-PCR مجزا با استفاده از پرایمرها (جدول ضمیمه ۲) و برنامه های اختصاصی استفاده شد.

بررسیهای آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار GraphPad Prism و تکنیکهای Fisher's exact test و Chi Square استفاده شد.

نتایج

شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به

متی سیلین و ونکومايسين

بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای PCR، تمامی ۸۵۹ ایزوله به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. همچنین، به دنبال کشت سویه ها بر روی محیطهای واجد آنتی بیوتیک اگراسیلین در مجموع ۱۹۶ سویه (۲۳ درصد) به عنوان سویه های مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. علاوه بر این، ۵ سویه (۰/۶ درصد) نیز بر روی محیط واجد ونکومايسين رشد کردند که به عنوان سویه های مقاوم به ونکومايسين شناسایی شدند. تمامی سویه های مقاوم به ونکومايسين دارای مقاومت به متی سیلین نیز بودند. بنابراین در مجموع ۳ درصد سویه های استافیلوکوکوس

اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد مقاومت به ونکومايسين نیز بودند. همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده، سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به ترتیب از نمونه های زخم (۴۰ درصد)، ادرار (۲۳ درصد)، خون (۱۷ درصد)، خلط (۱۵ درصد) و مایع مغزی نخاعی (۵ درصد) جداسازی شدند. همچنین، بیشترین تعداد سویه نیز مربوط به بخشهای داخلی (۴۳ درصد) و مراقبتهای ویژه (۲۹ درصد) بودند. علاوه بر این، از مجموع ۱۹۶ سویه، ۸۵ (۴۳ درصد) و ۱۲۱ (۵۷ درصد) سویه به ترتیب از نمونه های بیماران آقا و خانم جداسازی شدند. از ۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومايسين، ۴ سویه (۸۰ درصد) متعلق به نمونه های آقایان بستری در بخش مراقبتهای ویژه بود و ۱ سویه (۲۰ درصد) نیز از نمونه های خانمها در بخش مراقبتهای ویژه جداسازی شدند، که از این تعداد ۳ (۶۰ درصد) و ۲ سویه (۴۰ درصد) به ترتیب مربوط به نمونه های زخم و خلط بودند. به علاوه، در این مطالعه ۷۵ (۳۸ درصد) و ۱۲۱ (۶۲ درصد) سویه به ترتیب از بیماران ساکن در استان تهران و ساکنین سایر استانها جداسازی شدند.

جدول ۱- فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های بیماران در بخشهای مختلف بیمارستان.

بخش	ادرار (درصد)	خلط (درصد)	خون (درصد)	زخم (درصد)	مایع مغزی نخاعی (درصد)	جمع (درصد)
جراحی	۴ (۹)	۰	۳ (۹)	۱۵ (۱۹)	۱ (۱۱)	۲۳ (۱۲)
داخلی	۲۶ (۵۷)	۲۰ (۷۰)	۱۴ (۴۳)	۱۹ (۲۴)	۵ (۵۶)	۸۴ (۴۳)
زنان	۸ (۱۷)	۱ (۳)	۰	۱۳ (۱۷)	۰	۲۲ (۱۱)
کودکان	۲ (۴)	۱ (۳)	۶ (۱۸)	۱ (۱)	۰	۱۰ (۵)
مراقبتهای ویژه	۶ (۱۳)	۷ (۲۴)	۱۰ (۳۰)	۳۱ (۳۹)	۳ (۳۳)	۵۷ (۲۹)
جمع (درصد)	۴۶ (۲۳)	۲۹ (۱۵)	۳۳ (۱۷)	۷۹ (۴۰)	۹ (۵)	۱۹۶

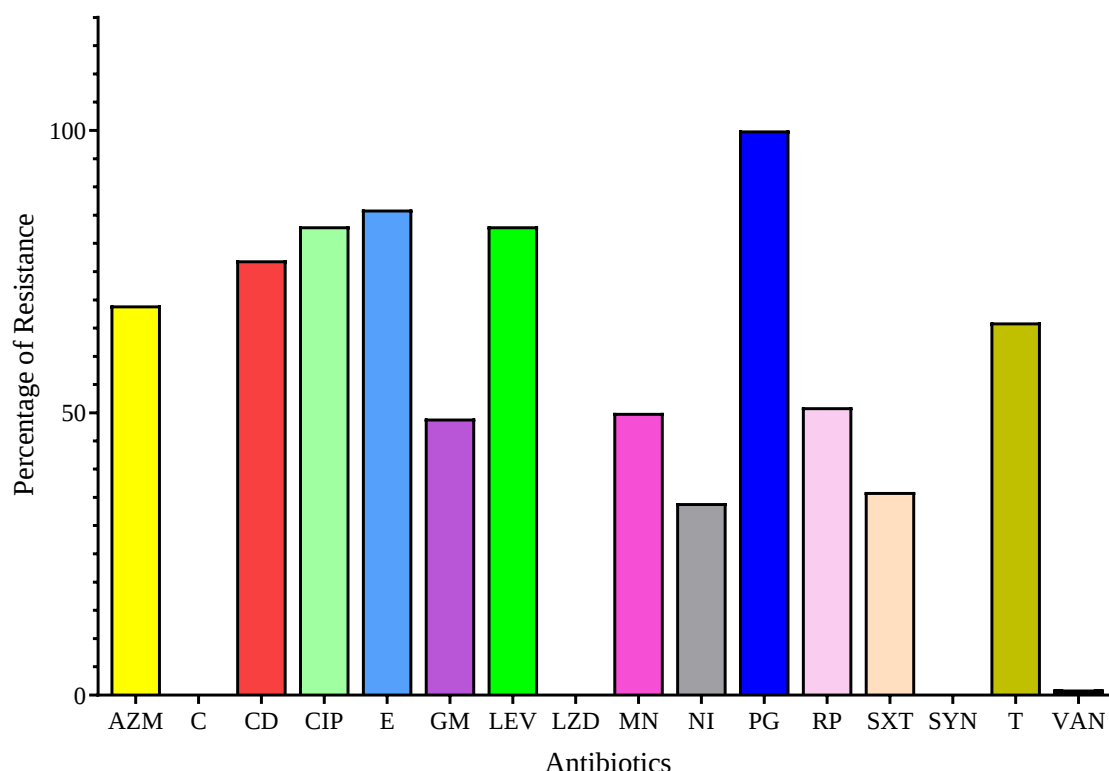
تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين

بر اساس نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک، تمامی ۱۹۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس که از محیط واجد پودر اگراسیلین جمع آوری شده بودند نسبت به دیسک سفوکسی

تین نیز مقاوم بودند و بنابراین مقاومت این سویه ها نسبت به متی سیلین مورد تأیید قرار گرفت. پس از بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها نسبت به سایر دیسکها مشخص شد (شکل ۱) که تمامی سویه ها نسبت به پنی سیلین G مقاوم و نسبت به آنتی بیوتیکهای کلرامفنیکل، کینوپریستین-دالفوپریستین و لینزولاید حساس هستند. همچنین، ۲۸ سویه

مورد بررسی نسبت به ۱۳-۱ آنتی بیوتیک مقاوم بودند و بر این اساس در مجموع ۲۱ الگوی مقاومتی (۱۳-۱ آنتی بیوتیک) در میان تمامی ۱۹۶ سویه های مقاوم به متی سیلین و ۲ الگوی مقاومتی (۱۲ و ۱۳ آنتی بیوتیک) در میان ۵ سویه مقاوم به ونکومايسين مشاهده شد، که به ترتیب ۲ و ۴ درصد سویه ها نسبت به ۱۳ و ۱۲ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند. به علاوه، ۲۴ و ۲۳ درصد سویه ها نیز به ترتیب نسبت به ۱۱ و ۱۰ آنتی بیوتیک مقاوم بودند. الگوهای مقاومتی شماره ۱ (مقاومت به ۱ آنتی بیوتیک) و شماره ۱۶ (مقاومت به ۱۱ آنتی بیوتیک) به عنوان الگوهای غالب معرفی شدند. همچنین، ۸۳ درصد سویه ها نیز که حداقل نسبت به ۳ کلاس مختلف آنتی بیوتیکی (الگوهای شماره ۲۰-۳) مقاومت نشان دادند به عنوان سویه های واجد مقاومت چندگانه مورد شناسایی قرار گرفتند.

(۱۴ درصد) تنها نسبت به پنی سیلین G مقاومت نشان دادند و نسبت به سایر آنتی بیوتیکهای مورد استفاده حساس بودند. علاوه بر این، بالاترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نیز به ترتیب نسبت به اریترومايسين (۸۶ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۳ درصد)، لووفلوکساسین (۸۳ درصد)، کلیندامایسین (۷۷ درصد)، آزیترومایسین (۶۹ درصد) و تتراسایکلین (۶۶ درصد) مشاهده شد و مقاومت سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به سایر آنتی بیوتیکهای مورد بررسی ۵۱-۳۴ درصد بود. در مقابل، ۵ سویه /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به ونکومايسين نسبت به تمامی آنتی بیوتیکها به استثناء جنتامایسین ۱۰۰ درصد مقاوم بودند و مقاومت به جنتامایسین نیز ۶۰ درصد بود. علاوه بر این، همانگونه که در جدول ۲ آورده شده است، سویه های



شکل ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین.

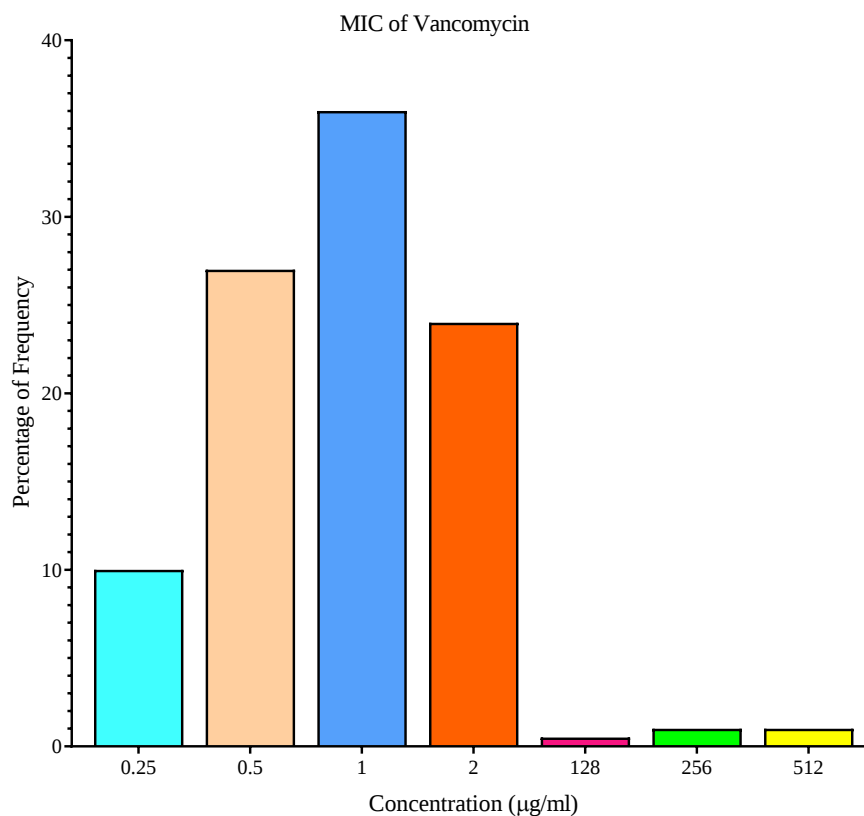
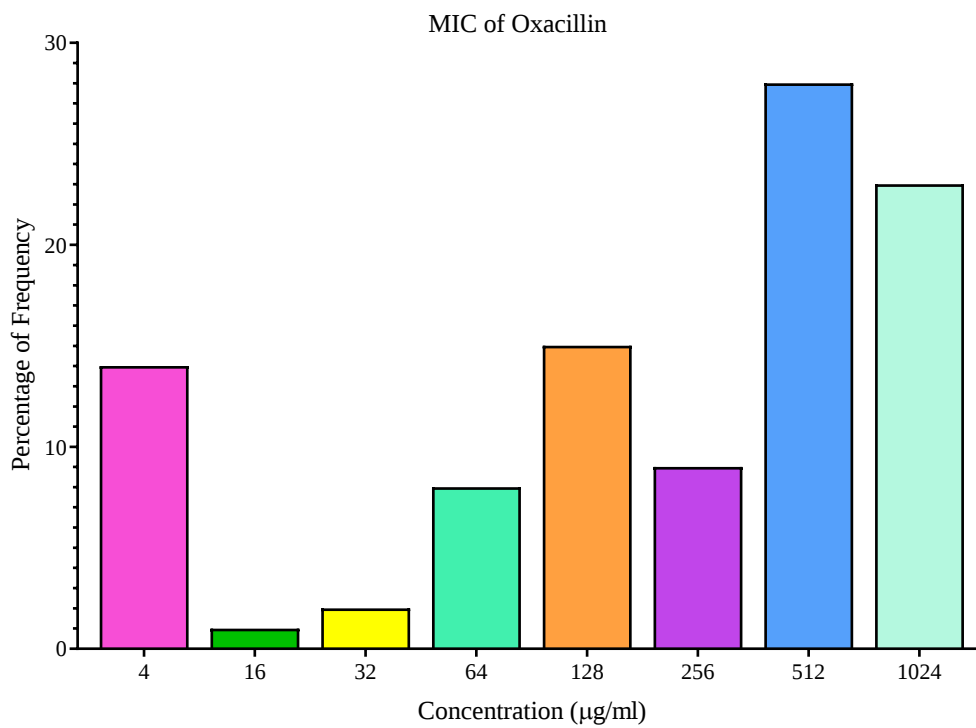
پیشتر تنها نسبت به پنی سیلین G مقاومت نشان دادند برابر با ۴ میکروگرم/میلی لیتر بود. علاوه بر این، مشخص شد که ۹۷ درصد سویه ها نیز حساس به ونکومايسين بودند ($0.25 \leq MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$) (شکل ۲) و تنها ۵ سویه (۳ درصد) مقاوم به ونکومايسين بودند ($128 \leq MIC \leq 512 \mu\text{g/ml}$)، بنابراین هیچکدام از سویه های مورد بررسی واجد مقاومت کاهش یافته نسبت به ونکومايسين نبودند.

نتایج حاصل از آزمونهای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیک اگزاسیلین نشان داد که تمامی سویه ها نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند ($MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$) (شکل ۲) و ۷۵ درصد سویه ها مقاومت سطح بالایی نسبت به اگزاسیلین نشان دادند ($MIC \geq 128 \mu\text{g/ml}$). همچنین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۲۵ درصد از سویه ها در بازه ۴-۶۴ میکروگرم/میلی لیتر قرار داشت. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ۱۴ درصد سویه ها که

جدول ۲- الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومايسين.

آنتی بیوتیک	الگو	MRSA (درصد)	VRSA (درصد)
۱ آنتی بیوتیک		۲۸ (۱۴)	۰
PG	۱	۲۸ (۱۴)	۰
۲ آنتی بیوتیک		۵ (۳)	۰
E, PG	۲	۵ (۳)	۰
۴ آنتی بیوتیک		۱۳ (۷)	۰
LEV, CIP, E, PG	۳	۱۳ (۷)	۰
۵ آنتی بیوتیک		۱۵ (۸)	۰
CD, LEV, CIP, E, PG	۴	۱۵ (۸)	۰
۶ آنتی بیوتیک		۸ (۴)	۰
AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۵	۸ (۴)	۰
۹ آنتی بیوتیک		۲۱ (۱۱)	۰
MN, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۶	۶ (۳)	۰
MN, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۷	۷ (۳)	۰
GM, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۷	۳ (۲)	۰
GM, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۹	۵ (۳)	۰
۱۰ آنتی بیوتیک		۴۶ (۲۳)	۰
MN, SXT, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۰	۶ (۳)	۰
GM, SXT, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۱	۷ (۳)	۰
MN, GM, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۲	۹ (۵)	۰
NI, GM, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۳	۱۴ (۷)	۰
NI, MN, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۴	۱۰ (۵)	۰
۱۱ آنتی بیوتیک		۴۸ (۲۴)	۰
GM, MN, SXT, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۵	۱۷ (۹)	۰
NI, GM, MN, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۶	۲۴ (۱۲)	۰
NI, GM, MN, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۷	۷ (۳)	۰
۱۲ آنتی بیوتیک		۹ (۴)	۲ (۴۰)
VAN, NI, MN, SXT, RP, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۸	۲ (۱)	۲ (۴۰)
NI, GM, MN, RP, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۱۹	۷ (۳)	۰
۱۳ آنتی بیوتیک		۳ (۲)	۳ (۶۰)
VAN, NI, GM, MN, RP, SXT, T, AZM, CD, LEV, CIP, E, PG	۲۰	۳ (۲)	۰

اختصارات عبارتند از: AZM: آزیترومايسين، E: اريترومايسين، T: تتراسايكلين، GM: جنتامايسين، CIP: سيپروفلوکساسين، SXT: نري متوپريم-سولفامتوکسازول، RP: ريفامپين، MN: مينوسايكلين، PG: پني سيلين، G، LEV: لووفلوکساسين، CD: کليندامايسين، NI: نيتروفورانتوئين و VAN: ونکومايسين.



شکل ۲- حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیکهای اگزا سيلين و ونکومايسين.

بررسی الگوی ژنی مقاومت به متیسیلین و ونکومايسين و SCCmec تایپینگ در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دنبال انجام SCCmec تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین واجد ژن *mecA* ، تمامی تایپهای I-V در سویه های مورد مطالعه شناسایی شدند. بر این اساس، ۴۸، ۲۳ و ۱۵ درصد سویه ها به ترتیب حامل SCCmec تایپهای III، I و II بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین اکتسابی از بیمارستان دسته بندی شدند. همچنین ۲۸ سویه مقاوم به پنی سیلین G و واجد $MIC_{OXA} \geq 4 \mu g/ml$ اگزاسیلین نیز به ترتیب دارای تایپهای V (۷ درصد)، IVa (۵ درصد) و IVc (۲ درصد) بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین اکتسابی از جامعه مورد شناسایی قرار گرفتند. علاوه بر این، تایپهای ۱، ۲، ۳ و ۵ *CCR* نیز به ترتیب در ۲۳، ۲۲، ۴۸ و ۷ درصد سویه ها شناسایی شدند و حضور *CCR* تایپها کاملاً منطبق بر SCCmec تایپهای شناسایی شده بود. از میان ژنوتایپهای مختلف *vanA-vanG* تمامی سویه ها تنها واجد ژن *vanA* بودند و هیچکدام از ژنوتایپهای دیگر در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين شناسایی نشد.

پروفاژ تایپینگ و *agr* تایپینگ سویه ها

در این مطالعه هیچکدام از سویه ها حامل پروفاژ تایپ تخریبگر SGD نبودند و تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین و مقاوم به ونکومايسين حداقل واجد پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ آن (SGFa و SGFb) بودند (جدول ۳). پروفاژ تایپهای SGA و SGL تنها در ۲۸ سویه (۱۴ درصد) اکتسابی از جامعه حاضر بودند و فراوانی پروفاژ تایپ SGB نیز محدود به ۶۵ درصد سویه ها بود. در مجموع، ۴ الگوی پروفاژی در این سویه ها شناسایی شد که الگوی پروفاژی شماره ۳ شامل پروفاژ تایپهای SGB، SGF، SGFa و SGFb غالبترین الگو بود. همچنین ۹ درصد سویه های مقاوم به متیسیلین نیز واجد الگوی شماره ۱ (متشکل از تمامی پروفاژ تایپهای شناسایی شده در این مطالعه) بودند. از طرف دیگر، تمامی ۵ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين نیز حاوی الگوی پروفاژی شماره ۳ و فاقد پروفاژ تایپهای SGA و SGL و اکتسابی از بیمارستان بودند. براساس نتایج حاصل از *agr* تایپینگ، هر ۴ تایپ *agr* در این مطالعه شناسایی شدند که تایپ I فراوانترین تایپ در میان سویه های مقاوم به متیسیلین بود (۵۲ درصد) و فراوانی تایپهای II، III و IV نیز به ترتیب محدود به ۲۶، ۱۳ و ۹ درصد سویه ها بود. همچنین، سویه های مقاوم به ونکومايسين تنها از نظر حضور دو *agr* تایپ II (۶۰ درصد) و III (۴۰ درصد) مثبت بودند و *agr* تایپ های I و IV در این سویه ها شناسایی نشد.

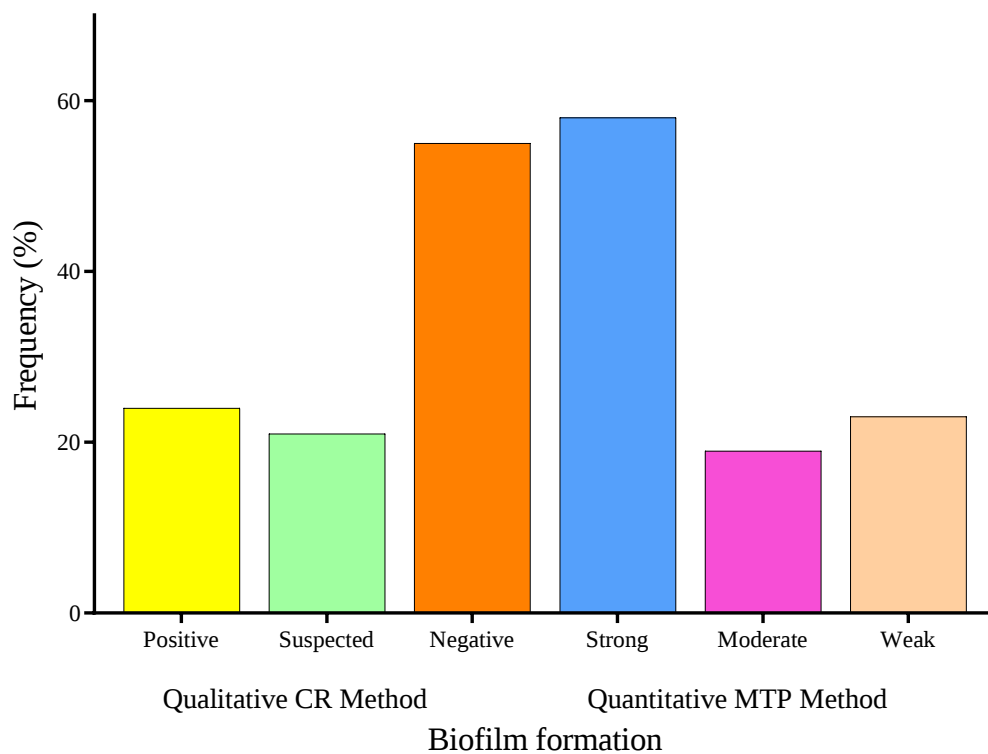
جدول ۳- فراوانی پروفاژ تایپها و الگوهای پروفاژی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین.

الگو	پروفاژ تایپ						تعداد	درصد	نوع سویه
	SGa	SGB	SGF	SGFa	SGFb	SGL			
۱	+	+	+	+	+	+	۱۹	۹	CA-MRSA
۲	+	-	+	+	+	+	۹	۵	CA-MRSA
۳	-	+	+	+	+	-	۱۱۷	۶۰	HA-MRSA
۴	-	-	+	+	+	-	۵۱	۲۶	HA-MRSA

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم

نتایج آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص کرد که از مجموع ۱۹۶ سویه /ستافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین، ۱۰۷ سویه (۵۵ درصد) واجد کلنیهای با مورفوتایپ قرمز روشن بودند (شکل ۳) و به عنوان سویه های اسلایم منفی از ادامه بررسی خارج شدند. همچنین، ۴۸ (۲۴ درصد) و ۴۱ (۲۱) سویه به ترتیب با کلنیهای مشکی و قرمز تیره به عنوان سویه های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک شناسایی شدند (شکل ۳).

بر اساس نتایج آزمون کمی میکروتیتر پلیت، تمامی ۸۹ سویه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که ۵۸ درصد (۵۲ سویه)، ۱۹ درصد (۱۷ سویه) و ۲۳ درصد (۲۰ سویه) سویه ها به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند (شکل ۳). همچنین، تمامی ۵ سویه /ستافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به ونکومايسين واجد کلنیهای با مورفوتایپ مشکی رنگ (اسلایم مثبت) و ۱۰۰ درصد مولد بیوفیلم قوی بودند.

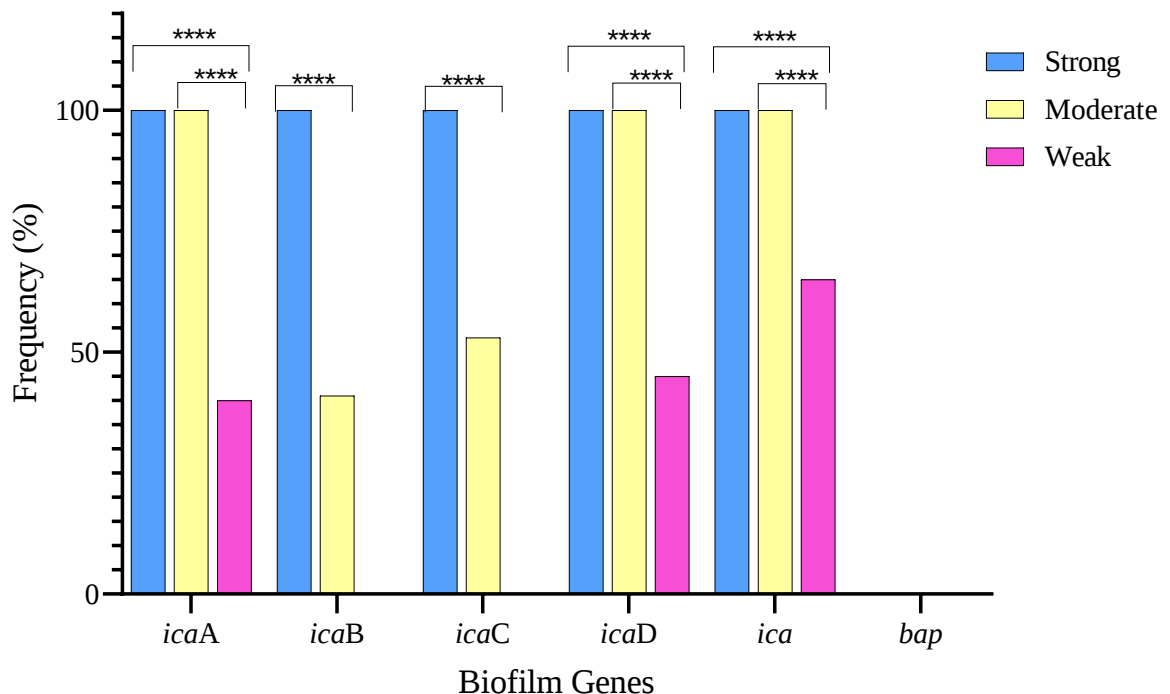


شکل ۳- درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم با روشهای کیفی و کمی در سویه های /ستافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین.

تعیین حضور ژنهای مؤثر بر تشکیل بیوفیلم

در این مطالعه، ۸۲ سویه (۹۲ درصد) حامل اپرون *ica* بودند و ژنهای *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* به ترتیب در ۸۶، ۶۶، ۶۹ و ۸۸ درصد سویه های بیوفیلم مثبت شناسایی شدند و هیچکدام از سویه ها واجد ژن *bap* نبودند (شکل ۴). همچنین، تمامی سویه های مولد بیوفیلم قوی حاوی ژنهای اپرون *icaADBC* بودند؛ در حالیکه در ۱۰۰ درصد سویه های مولد بیوفیلم متوسط ژنهای *icaA* و *icaD* حاضر بودند و ۴۱ و ۵۳ درصد سویه ها از نظر

ژنهای *icaB* و *icaC* مثبت بودند. علاوه بر این، سویه های مولد بیوفیلم ضعیف فاقد دو ژن *icaB* و *icaC* بودند و فراوانی ژنهای *icaA* و *icaD* نیز به ترتیب ۴۰ و ۴۵ درصد بود. همچنین، اختلاف معنی داری بین حضور ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم قوی با سویه های مولد بیوفیلم متوسط و ضعیف مشاهده شد ($P < 0.0001$). از طرف دیگر، تمامی ژنهای بیوفیلمی مورد بررسی در ۵ سویه مقاوم به ونکومايسين مولد بیوفیلم قوی شناسایی شدند.



شکل ۴- درصد فراوانی ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

****: $P < 0.0001$

بحث

در مطالعه حاضر فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بیمارستان مورد بررسی در بازه زمانی ۲ ساله ۲۳ درصد ارزیابی شد که این آمار در مقایسه با سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر کشورها از فراوانی بسیار پایینتری برخوردار می باشد (۹-۳، ۱۷، ۲۳-۲۳). تفاوت در شرایط بهداشتی، فرهنگی و اقتصادی بیماران و همچنین سطح کنترل عفونت و بهداشت بیمارستانی می تواند در پایین بودن میزان شیوع در این مطالعه نقش داشته باشد. نکته دیگر آنکه در بسیاری از مطالعات پیشین، جدایه ها از بیماران بستری و سربایی جمع آوری شده بودند، در حالی که در این مطالعه تمامی بیماران مورد بررسی بستری بودند. این موضوع می تواند یکی از دلایل اصلی پایین تر بودن میزان شیوع در مطالعه حاضر، با توجه به گسترش روزافزون سویه های مقاوم در جامعه، باشد. همچنین، بیشتر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در این مطالعه از نمونه های زخم (۴۰ درصد) و بیماران بستری در بخش داخلی (۴۳) جداسازی شده بودند که این امر می تواند ناشی از توانایی بالاتر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* برای تشکیل بیوفیلم در زخمها باشد که باعث محافظت از این باکتریها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی بیوتیکها می شود (۳۴). از طرف دیگر، فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين پيش از سال ۲۰۱۰ برابر با ۱/۲ درصد و پس از آن تا سال ۲۰۱۹ نیز ۲/۴ درصد محاسبه شده است که ۲ برابر افزایش یافته است (۳۵). در این مطالعه نیز ۳ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین نسبت به ونکومايسين مقاوم و واجد ژن *vanA* بودند.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين مشخص شد که تمامی سویه ها نسبت به پنی سیلین مقاوم و نسبت به لینزولاید، کینوپریستین-دالفوپریستین و کلرامفنیکل حساس بودند که این یافته کاملاً منطبق بر مطالعات پیشین است (۶، ۸، ۲۴، ۳۶، ۳۷)؛ بنابراین، این ۳ آنتی بیوتیک به عنوان مؤثرترین ترکیبات ضد میکروبی جهت درمان عفونتهای ناشی از سویه های مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين در این مطالعه معرفی شدند. حساسیت مشاهده شده به این آنتی بیوتیکها می تواند ناشی از عدم مصرف یا مصرف بسیار محدود آنها در کشور باشد؛ چرا که این داروها به عنوان خط اول درمانی برای عفونتهای ناشی از سویه های مقاوم به متی سیلین مورد استفاده

قرار نمی گیرند. گرچه کلرامفنیکل، لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین به عنوان گزینه های درمانی باقی ماندند؛ اما سمیت بالای کلرامفنیکل و هزینه بالای دو داروی دیگر، استفاده عملی از آنها را دشوار می سازد.

در مطالعه حاضر ۵۸، ۱۹ و ۲۳ درصد سویه ها به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. همچنین، تمامی سویه های مقاوم به ونکومايسين اسلایم مثبت و قادر به تشکیل بیوفیلم قوی بودند که مشابه با مطالعه انجام گرفته در مصر بود که در آن ۹۱/۶ درصد سویه های مقاوم به متی سیلین و ۱۰۰ درصد سویه های مقاوم به ونکومايسين بیوفیلم مثبت بودند (۵). Weigel و همکاران در سال ۲۰۰۷ اعلام کردند که مقاومت نسبت به ونکومايسين با تشکیل بیوفیلم تشدید می شود (۳۸).

در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی سیلین ژنهای اپرون *ica* نقش کلیدی در تشکیل بیوفیلم ایفا می کند (۳). در مطالعه حاضر ۹۲ درصد سویه ها واجد اپرون *ica* بودند و فراوانی ژنهای *icaA* و *icaD* در ۸۶ و ۸۸ درصد سویه های بیوفیلم مثبت شناسایی شدند. از طرف دیگر، علیرغم اینکه در برخی از مطالعات اپرون *icaADBC* را به عنوان تنها عامل چسبندگی و تشکیل بیوفیلم در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مطرح کرده اند (۳۹، ۴۰)، اما در سایر مطالعات به اهمیت سایر ژنها در کنار این اپرون جهت تشکیل بیوفیلم نیز پرداخته شده است (۳، ۸، ۳۶). علاوه بر این، مشابه با یافته های پیشین (۵، ۴۰، ۴۱)، ژن *bap* در هیچکدام از سویه های مولد بیوفیلم شناسایی نشد. بنابراین به نظر می رسد که ژن *bap* به رمزکننده پروتئین سطحی سلولی است در بیشتر سویه های مولد بیوفیلم از اهمیت پایینتری در مقایسه با ژنهای اپرون *ica* یا سایر ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم نظیر *sigB*، *clfA*، *fnbpA*، *sar* و ...، برخوردار می باشد. بر این اساس، می توان نتیجه گیری کرد که سویه های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومايسين از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم با یکدیگر بسیار متفاوت هستند که ناشی از تفاوت در منشاء جداسازی (انسان یا حیوان)، شرایط جغرافیایی و ماهیت سویه های مورد مطالعه می باشد (۵).

ژن *agr* به عنوان مسئول تنظیم بیان تولید پروتئینهای درون و خارج سلولی، انواع سموم و عوامل بیماریزایی در *استافیلوکوکوس اورئوس* شناخته می شود؛ همچنین، در سویه های مولد بیوفیلم نیز بیان *agr* منجر به جدا شدن بیوفیلم تشکیل شده می شود (۳). در سویه های مورد بررسی هر ۴ تایپ *agr* شناسایی شدند و

بودند شناسایی شد و سویه های بیمارستانی هیچکدام واجد این پروفاز تایپ نبودند. فراوانی بالای پروفاز تایپهای مختلف منجر به تولید احتمالی عوامل حدتی مانند بتا-لیزین، استافیلوکیناز، توکسین سندرم شوک سمی، توکسین اکسفولیاتیو، لوکوسیدین پنتون-ولنتاین، انتروتوکسینهای مختلف A, E, G, K, P, Q و لیپاز در این سویه ها می شود که حضور این عوامل حدت در این سویه ها مؤید گردش سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومايسين بالقوه بیماریزا و واجد مقاومت های چندگانه و سطح بالا در میان بیماران در شهر تهران است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومايسين مولد بیوفیلیم، مقاوم به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها و واجد انواع مختلف پروفاز تایپها با پتانسیل بیماریزایی بالا در میان بیماران مبتلا به عفونتهای مختلف است. پراکندگی سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به ونکومايسين در میان بیماران نشان دهنده انتشار کلون تایپهای خاص باکتریایی در بیمارستان مورد نظر در تهران است که یک هشدار جدی برای سیستمهای بهداشتی محسوب می شود. بنابراین، به نظر می رسد که سیاستهای کنترل عفونت فعلی جهت ممانعت از انتشار این سویه های مقاوم چندان مؤثر نبوده و کاهش فراوانی یا حذف و ریشه کنی این سویه ها نیازمند بازنگری جدی پروتکل های عفونی و تمهیدات اندیشیده شده و اتخاذ سیاستهای کنترل عفونت مؤثر و کارآمد جدید می باشد.

محدودیتها

این مطالعه به مدت دو سال در یک بیمارستان در شهر تهران انجام گرفته است که نتیجه گیری دقیقتر نیازمند نیازمند همکاری بیمارستانها با محققین و صدور مجوز جهت بررسی شرایط محیطی بخشهای مختلف بیمارستانها و حتی نمونه های فاضلاب جهت بررسی جامعتر بر روی بیمارستانها و بیماران بیشتر، می باشد. همچنین، استفاده از روشهای تایپینگ مولکولی جهت بررسی انتشار کلونال این سویه ها در تهران و سایر شهرهای کشور نیز پیشنهاد می شود.

agr تایپ I فراوانترین تایپ شناسایی شده در میان سویه های مقاوم به متی سیلین و *agr* تایپ II غالبترین تایپ در سویه های مقاوم به ونکومايسين بود. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که سویه های دارای *agr* تایپهای II و III به دلیل داشتن نقص در رونویسی ژن *icaR* که رمزکننده سرکوبگر اپرون *icaADBC* است، قادر به تولید فراوان بیوفیلیم هستند. در سال ۲۰۲۲، مصطفوی و همکاران *agr* تایپ I را به عنوان تایپ غالب در سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مولد بیوفیلیم در اصفهان معرفی کردند و ۴۰ درصد سویه های مورد بررسی در آن مطالعه نیز فاقد هر چهار تایپ *agr* بودند (۴۲). به طور کلی با توجه به تفاوت در گزارشات مختلف به نظر می رسد که نتیجه گیری Croes و همکاران مبنی بر عدم وجود ارتباط بین تایپ *agr* و توانایی تشکیل بیوفیلیم بالا می تواند صحیح باشد (۴۳).

در مطالعه حاضر در مجموع پنج SCCmec تایپ مختلف (I-V) و ۴ تایپ *ccr* (۱، ۲، ۳ و ۵) در تمامی سویه های مقاوم به متی سیلین و سه تایپ (I-III) در میان سویه های اکتسابی از بیمارستان شناسایی شدند که SCCmec تایپ III و تایپ ۳ *ccr* غالبترین و فراوانترین تایپها بودند. سویه های اکتسابی از جامعه نیز حامل دو SCCmec تایپ (IV و V) و دو تایپ *ccr* (۲ و ۵) بودند که SCCmec تایپ V و تایپ ۲ *ccr* نیز غالبترین تایپها در این سویه ها بودند. این یافته ها مشابه با سایر گزارشات از ایران می باشند که در آنها SCCmec تایپ III و *ccr* تایپ ۳ به عنوان فراوانترین تایپها در ایران معرفی شده اند (۸-۶، ۳۶، ۴۴، ۴۵). سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان سالها به عنوان سویه های باکتریایی غالب در بیمارستانها و جامعه در حال گردش هستند که به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی بالا نسبت به داروهای خطوط اول و دوم درمانی همواره به عنوان معضل بهداشتی در کشورهای مختلف مطرح بوده اند. عدم رعایت اصول کنترل عفونت و موازین بهداشتی توسط پزشکان و سایر پرسنل درمانی باعث انتقال این سویه ها به بیماران و پراکندگی آنها در جوامع شده است و همین امر بیماران را به ناقلین گذرا مبدل کرده است (۴، ۹). همچنین، پروفاز تایپهای مختلفی نیز در میان سویه های /استافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین و ونکومايسين یافت شد که مطابق با سایر مطالعات، پروفاز تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb فراوانترین پروفاز تایپهای شناسایی شده بودند (۷، ۱۹، ۳۶، ۳۷). از طرف دیگر، حضور پروفاز تایپ SGA تنها در سویه های اکتسابی از جامعه که همگی حساس به ونکومايسين نیز

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه اصفهان است که با کد اخلاق شماره IR.UI.REC.1403.110 به انجام رسیده است.

منابع مالی

نویسندگان مقاله هیچگونه کمک مالی و گرنت پژوهشی جهت انجام این تحقیق دریافت نکرده اند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

جدول ضمیمه ۱-توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی (۵' به ۳')
<i>nucA</i> -F	TAATGTACAAAGGTCAAC
<i>nucA</i> -R	TGATAAATATGGACGTGGCT
<i>mecA</i> -F	TGGCTATCGTGTCAACAATCG
<i>mecA</i> -R	CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG
<i>vanA</i> -F	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA
<i>vanA</i> -R	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA
<i>vanB</i> -F	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA
<i>vanB</i> -R	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA
<i>vanC1/2</i> -F	ATGGATTGGTAYTKGTATc
<i>vanC1/2</i> -R	TAGCGGGAGTGMCYMGTAAc
<i>vanD</i> -F	TGTGGGATGCGATATTCAA
<i>vanD</i> -R	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA
<i>vanE</i> -F	TGTGGTATCGGAGCTGCAG
<i>vanE</i> -R	ATAGTTTAGCTGGTAAC
<i>vanG</i> -F	CGGCATCCGCTGTTTTTGA
<i>vanG</i> -R	GAACGATAGACCAATGCCTT
SCC <i>mec</i> type I-F	GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG
SCC <i>mec</i> type I-R	GTCTCTCATAGTATGACGTCC
SCC <i>mec</i> type II-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG
SCC <i>mec</i> type II-R	CGAAATCAATGGTTAATGGACC
SCC <i>mec</i> type III-F	CCATATTGTGTACGATGCG
SCC <i>mec</i> type III-R	CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG
SCC <i>mec</i> type IVa-F	GCCTTATTCTGAAGAAACCG
SCC <i>mec</i> type IVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG
SCC <i>mec</i> type IVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC
SCC <i>mec</i> type IVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC
SCC <i>mec</i> type IVc-F	ACATATTTGTATTATCGGAGAGC
SCC <i>mec</i> type IVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG
SCC <i>mec</i> type IVd-F	CTCAAAATACGGACCCCAATACA
SCC <i>mec</i> type IVd-R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG
SCC <i>mec</i> type V-F	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG
SCC <i>mec</i> type V-R	TGAAAGTTGTACCCTTGACACC
Type 1 <i>ccr</i> -βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT
Type 1 <i>ccr</i> -α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT
Type 2 <i>ccr</i> -βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT
Type 2 <i>ccr</i> -α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT
Type 3 <i>ccr</i> -βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT
Type 3 <i>ccr</i> -α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT
Type 5 <i>ccr</i> -βc	ATGAATTCAAAGAGCATGGC
Type 5 <i>ccr</i> -α	GATTTAGAATTGTCGTGATTGC

جدول ضمیمه ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی (۵' به ۳')
SGA-F	TATCAGGCGAGAATTAAGGG
SGA-R	CTTTGACATGACATCCGCTTGAC
SGB-F	ACTTATCCAGGTGGYGTATTG
SGB-R	TGTATTTAATTTTCGCCGTTAGTG
SGD-F	TGGGCTTCATTCTACGGTGA
SGD-R	GTAATTTAATGAATCCACGAGAT
SGF-F	CGATGGACGGCTACACAGA
SGF-R	TTGTTCAGAACTTCCCAACCTG
SGFa-F	TACGGGAAAATATTCGGAAG
SGFa-R	ATAATCCGCACCTCATTCCT
SGFb-F	AGACACATTAAGTCGCACGATAG
SGFb-R	TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT
SGL-F	GCTTAAACAGTAACGGTGACAGTG
SGL-R	TGCTACATCATCAAGAACACCTGG
<i>icaA</i> -F	CCTAACTAACGAAAGGTAG
<i>icaA</i> -R	AAGATATAGCGATAAGTGC
<i>icaB</i> -F	AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT
<i>icaB</i> -R	TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT
<i>icaC</i> -F	ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA
<i>icaC</i> -R	TAATAAGCATTAATGTTCAATT
<i>icaD</i> -F	AAACGTAAGAGAGGTGG
<i>icaD</i> -R	GGCAATATGATCAAGATA
<i>bap</i> -F	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC
<i>bap</i> -R	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC
Type 1 <i>agr</i> -F	ATGCACATGGTGCACATGC
Type 1 <i>agr</i> -R	GTC ACAAGTACTATAAGCTGCGAT
Type 2 <i>agr</i> -F	ATGCACATGGTGCACATGC
Type 2 <i>agr</i> -R	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC
Type 3 <i>agr</i> -F	ATGCACATGGTGCACATGC
Type 3 <i>agr</i> -R	CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC
Type 4 <i>agr</i> -F	ATGCACATGGTGCACATGC
Type 4 <i>agr</i> -R	CGATAATGCCG TAATAC CCG

REFERENCE

1. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research*. 2020;21:169-76.
2. Rasigade J-P, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;21:510-4.
3. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microbial Pathogenesis*. 2016;98:69-76.
4. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(6):796-804.
5. Kejela T, Dekosa F. High prevalence of MRSA and VRSA among inpatients of Mettu Karl referral hospital, southwest Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health*. 2022;27(8):735-41.
6. Rahimi F, Khashei S. Characteristics of prophage patterns and virulence gene profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*. 2023;9(1):15-23.
7. Rahimi F, Khashei S, Katouli M. Prevalence, diversity ,and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2024;19(3):e142081.
8. Mostafavi NS, Rahimi F, Khashei S. Characterization of clonal groups of antibiotic-resistant biofilm forming *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infections in Isfahan, Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2024;19(4):e143383.
9. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. *Microbial Pathogenesis*. 2016;97:89-93.
10. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(4):203-18.
11. Al-Amery K, Elhariri M, Elsayed A, El-Moghazy G, Elhelw R, El-Mahallawy H, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from camel meat and slaughterhouse workers in Egypt. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019;8(1):129.
12. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(1):1-45.
13. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2017;90(2):269.
14. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1342-7.
15. Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*. 2019;10 (8)1231-41.
16. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:107.

17. Saber T, Samir M, El-Mekawy RM, Ariny E, El-Sayed SR, Enan G, et al. Methicillin-and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from humans and ready-to-eat meat: characterization of antimicrobial resistance and biofilm formation ability. *Frontiers in Microbiology*. 2022;12:735494.
18. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2023.
19. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. *Journal of Water and Health*. 2021;19(2):216-28.
20. Goudarzi M, Navidinia M, Dadashi M, Hashemi A, Pouriran R. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples from Iran: prevalence and molecular characteristics. *New Microbes and New Infections*. 2021;39:100832.
21. Rahimi F. Isolation of vancomycin resistant enterococci from chicken meat samples in Isfahan, 2019. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2021;26(92):30-5.
22. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. *Archives of Virology*. 2012;157(9):1807-11.
23. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2018;13(5):e59385.
24. 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. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2009;4(3):143-50.
25. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2019;24(86):26-35.
26. Karimi A, Rahimi F. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan during 2017. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2019;24(87):43-50.
27. Aniba R, Dihmane A, Raqraq H, Ressmi A, Nayme K, Timinouni M, et al. Characterization of biofilm formation in uropathogenic *Staphylococcus aureus* and their association with antibiotic resistance. *The Microbe*. 2024;2:100029.
28. Mitiku A, Aklilu A, Biresaw G, Gize A. Prevalence and associated factors of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) among urinary tract infection suspected patients attending at Arba Minch General Hospital, Southern Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*. 2021:2133-42.
29. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. *Iranian Journal of Public Health*. 2016;45(4):485.
30. Garoy EY, Gebreab YB, Achila OO, Tekeste DG, Kesete R, Ghirmay R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern among patients-a multicenter study in Asmara, Eritrea. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2019;2019(1):8321834.
31. Dilnessa T, Bitew A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples at Yekatit 12 Hospital Medical College, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(1):398.
32. Firouzi F, Akhtari J, Nasrolahei M. Prevalence of MRSA and VRSA strains of *Staphylococcus aureus* in healthcare staff and inpatients. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016;26(142):96-107.
33. Moghaddam PZ, Azimian A, Sepahy AA, Iranbakhsh A. Isolation and genetic characterization of vancomycin-resistant and *mecC*+ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in clinical samples of Bojnurd, Northeastern Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2021;14(10):e118949.
- 34.

35. Silva V, Almeida L, Gaio V, Cerca N, Manageiro V, Caniça M. Biofilm formation of multidrug-resistant MRSA strains isolated from different types of human infections. *Pathogens*. 2021;10(8):970.
36. Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):12689.
37. Rahimi F, Khashei S. Evaluation of the nitric oxide effectiveness against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infections in Tehran during 2021-2023. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2024;29(106):33-53.
38. Rahimi F, Qasemi A. Frequency of biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran during 2020-2022. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2023;28(100):43-56.
39. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51:231-8.
40. Azmi K, Qrei W, Abdeen Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*. 2019;20:1-12.
41. Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *MicrobiologyOpen*. 2020;9:e946.
42. Dai J, Wu S, Huang J, Wu Q, Zhang F, Zhang J. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pasteurized milk in China. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:641.
43. Mostafavi NS, Rahimi F. Frequency of *agr* types and resistance to aminoglycosides among biofilm producing *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary infection in Isfahan during 2017. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2022;7(97):17-26.
44. Croes S, Deurenberg RH, Boumans M-LL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiology*. 2009;9(1):229.
45. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2019;14(4):389-98.
46. Shekarabi M, Hajikhani B, Salimi Chirani A, Fazeli M, Goudarzi M. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples: a three year study in Tehran, Iran. *PloS One*. 2017;12(8):e0183607.