

# بررسی ژن‌های VanA و VanB در استافیلوکوک‌های مقاوم به سفوکسیتین عامل عفونت‌های پوستی بیماران بستری در بیمارستان رازی تهران به روش Real Time PCR

**زمینه و هدف:** استافیلوکوک‌ها دومین علت شایع عفونت‌های بیمارستانی و مسئول حدود ۸۰٪ عفونت‌های چرکی و اغلب عفونت‌های پوستی هستند. ژن‌های VanA, VanB, VanC1, VanC2/C3, VanL, VanG و VanX مسئول کدکردن مقاومت نسبت به ونکومایسین، تیکوپلانیلین و آووپاراسین هستند. مقاومت VanA و VanB غالب‌ترین نوع مقاومت بوده که می‌توانند روی پلاسمید یا کروموزوم قرار گرفته از طریق کونژوگاسیون منتقل شوند. هدف از انجام این مطالعه بررسی وجود ژن‌های VanA و VanB در استافیلوکوک‌های مقاوم به سفوکسیتین و عامل عفونت‌های پوستی بیماران بستری در بیمارستان رازی تهران به روش Real Time PCR بوده است.

**روش اجرا:** جمع‌آوری نمونه‌ها از خرداد ۹۴ به مدت یک‌سال، در بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه بالینی بیمارستان رازی انجام شد؛ بدین‌صورت که زخم‌های ترشح‌دار بیماران پوستی توسط سوآپ استریل نمونه‌برداری شد و روی محیط بلاد آگار و EMB کشت داده و روی لام برده شد. بعد از رشد باکتری‌ها (کوکسی‌های گرم مثبت) بر روی محیط بلاد آگار، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و کوآگولاز انجام شد، برای تعیین حساسیت به ونکومایسین در استافیلوکوک‌های مقاوم به سفوکسیتین از روش E-test استفاده شد و ژن‌های VanA و VanB به وسیله Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** از ۹۷۸ بیمار دارای ضایعه پوستی ترشح‌دار، ۷۳۳ نمونه انواع استافیلوکوک جدا شد. از این تعداد ۱۲۴ نمونه مقاوم به سفوکسیتین بود که تست نواری ونکومایسین برایشان انجام شد و ۸ نمونه دارای جواب بالای ۳ و ۵ عدد از آن‌ها مقاومت بالا، یعنی بالای ۱۶ بودند. اما علت این مقاومت در هیچ کدام ژن‌های VanA و VanB نبود.

**نتیجه‌گیری:** به‌علت گسترش سویه‌های مقاوم استافیلوکوک در عفونت‌های پوستی و بیمارستانی، شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی آن در جهت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب برای کاهش دوره‌ی درمان و عوارض مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ضرورت دارد.

**کلیدواژه‌ها:** استافیلوکوکوس، مقاومت دارویی، عفونت پوستی، سفوکسیتین، ژن‌های عامل مقاومت

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۳۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۱۸

پوست و زیبایی؛ بهار ۱۳۹۶، دوره‌ی ۸ (۱): ۲۶-۲۲

دکتر فهیمه نعمتی<sup>۱</sup>  
معصومه محمدزکی<sup>۱</sup>  
صفر شامحمدی<sup>۲</sup>  
دکتر زینب قاسمی<sup>۲</sup>  
ابراهیم اسکندری<sup>۳</sup>

۱. گروه آموزشی نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی علوم و فناوری نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۲. بیمارستان رازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران  
۳. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسئول:  
فهیمه نعمتی

دانشکده‌ی علوم و فناوری نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلام، تهران، ایران  
پست الکترونیک:

f\_nemati82@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

## مقدمه

با افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی مواجه‌ایم. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا، به‌عنوان چالش مهم برای جامعه‌ی پزشکی

امروزه به‌دلیل استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها

استافیلوکوک اثر گذاشته و در عفونت‌های پوستی با منشأ استافیلوکوک به صورت روتین استفاده می‌شود و در صورت مقاومت از آنتی‌بیوتیک ونکومايسين به‌عنوان جایگزین استفاده می‌شود<sup>۵</sup>. هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود ژن‌های VanA و VanB در استافیلوکوک‌های مقاوم به سفوکسیتین عامل عفونت‌های پوستی بیماران بستری در بیمارستان رازی تهران به روش Real Time PCR بود.

### روش اجرا

جمع‌آوری نمونه‌ها از خرداد ۹۴ به مدت یکسال، در بخش میکروبی‌شناسی آزمایشگاه بالینی بیمارستان رازی انجام شد، زخم‌های ترشح‌دار بیماران پوستی توسط سوآپ استریل نمونه‌برداری شد و روی محیط بلاد آگار و EMB کشت داده و روی لام برده شد. بعد از رشد باکتری‌ها (کوکسی‌های گرم مثبت) بر روی محیط بلاد آگار، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و کواگولاز انجام شد. در صورت مثبت‌بودن کواگولاز، استافیلوکوک اورئوس گزارش شد<sup>۶-۸</sup> و در صورت منفی شدن از دیسک نووبیوسین استفاده شد که در ساپروفیتیکوس مقاومت ایجاد می‌شود و اپی‌درمیدیس به آن حساس است. برای تعیین حساسیت به ونکومايسين از استاف‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتینو از روش E-test استفاده شد، برای انجام این تست، باکتری روی محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شد، سپس نیم مک فارلند تهیه شده و آن را به روی محیط مولر هینتون برده و نوار ونکومايسين روی آن قرار داده شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه، انکوبه شد. طبق پروتکل کارخانه‌ی سازنده نتیجه‌ی مثبت به‌صورت رشد در اطراف نوار حاوی آنتی‌بیوتیک گزارش شد.

استخراج DNA به روش Boiling یا جوشاندن انجام شد. برای آزمایش PCR، پرایمرها به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت سیناژن خریداری شد و برای هر کدام از VanA و VanB، پرایمرهای forward و

در درمان بیماری‌های عفونی مطرح شده است. مقاومت اکتسابی باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، از طریق جهش ژن‌های کروموزومی یا انتقال از راه پلاسمید به‌دست آمده است<sup>۱</sup>.

بیش از ۹۰٪ از سویه‌های این باکتری به‌واسطه‌ی پنی‌سیلیناز پلاسمیدی به پنی‌سیلین مقاوم می‌باشند. ۵۰٪-۳۰٪ از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌واسطه‌ی ژن mecA و بیان PBP2a به پنی‌سیلین مقاوم به بتالاکتاماز (مانند نفسیلین، کلوزاسیلین و متی‌سیلین) و هم‌چنین تمامی بتالاکتام‌ها مقاوم هستند. ونکومايسين به‌تنهایی یا در ترکیب با ریفامپین برای درمان عفونت‌های مربوط به سویه‌های مقاوم در برابر متی‌سیلین توصیه شده است تا مقاومت به ریفامپین ایجاد نشود<sup>۲</sup>.

ژن‌های VanA، VanB، VanC1، VanC2/C3، VanL، VanG و VanX مسئول کد کردن مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله گروه بتالاکتام هستند. مقاومت VanA و VanB غالب‌ترین نوع مقاومت بوده که می‌توانند روی پلاسمید یا کروموزوم قرار گرفته و از طریق کونژوگاسیون منتقل شوند<sup>۳</sup>.

ژن‌های VanA و VanB به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های مسئول مقاومت، به ترتیب بر روی ترانسپوزون‌های Tn156 و Tn1547 قرار دارند که می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم یافت شود و توانایی ورود در پلاسمید کونژوگاتیو را دارند. این پلاسمید علاوه بر توانایی انتقال در بین گونه‌های مختلف استافیلوکوک، به جنس‌های دیگر باکتری از قبیل انتروکوک نیز منتقل می‌شود و استافیلوکوک‌های مقاوم ایجاد خواهد کرد که خود یکی از مشکلات بزرگ درمان عفونت‌های استافیلوکوکی خطرناک است. ژنوتایپ VanA از بقیه مهم‌تر است<sup>۴</sup>.

آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی سفالوسپورین‌های نسل دوم می‌باشد که بر روی طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و منفی از جمله کوکسی‌های گرم مثبت و به‌ویژه

reverse و آنزیم Taq پلیمر از شرکت سیناژن تهیه شد. آزمایش PCR در دستگاه ترمال سایکلر و Real Time PCR به روش سایبرگرین انجام شد. پری‌میکس سفارش داده‌شده مربوط به شرکت Gene all بود که حاوی آنزیم‌های DNA پلی‌مراز، بافر 10x، MgCl<sub>2</sub> و dNTP بود و از انتروکوک دارای VanA و VanB به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### یافته‌ها

از بین ۹۷۸ بیمار دارای ضایعه‌ی پوستی ترشح‌دار، که ۵۱٪ آن‌ها مرد و ۴۹٪ آن‌ها زن بودند، ۷۳۳ نمونه انواع استافیلوکوک جدا شد که برای آن‌ها آنتی‌بیوگرام و کشت در محیط مولر انجام گردید. از این تعداد ۱۲۴ نمونه مقاوم به سفوکسیتین بود. سپس نمونه‌های مقاوم به سفوکسیتین را روی محیط مولر برده و تست نواری ونکومایسین برای‌شان انجام شد که ۸ نمونه دارای جواب بالای ۳ بودند و ۵ عدد از این ۸ نمونه مقاومت بالا دادند یعنی بالای ۱۶ بودند. برای این ۸ نمونه Real Time PCR انجام شد اما علت این مقاومت در هیچ کدام ژن‌های VanA و VanB نبود.

### بحث

استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری گرم مثبت خوشه‌ای متعلق به خانواده‌ی میکروکوکاسیه و از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریال در انسان و حیوانات است. این باکتری به‌عنوان یک پاتوژن بالقوه که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند، شناخته شده است. این باکتری هم‌چنین از عوامل شایع مرگ‌ومیر در بیماران تحت همودیالیز می‌باشد. در برخی از بیمارستان‌ها این باکتری در بخش ICU شیوع بیشتری دارد و باعث بدحالی و مرگ‌ومیر بیماران می‌شود.

با بروز مقاومت نسبت به پنی‌سیلین‌ها، نسل جدیدی از داروها به بازار ارائه شد. متی‌سیلین یکی از پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز است که در سال ۱۹۶۰ عرضه شد. پس از آن اولین مورد

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به این دارو Methicillin resistant Staph aureus (MRSA) مشاهده گردید. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکینولون‌ها و ماکرولیدها کسب کرده است. امروزه روش‌های مختلف ژنوتیپی و فنوتیپی برای تشخیص VRSA ارائه شده است.

در سال‌های اخیر مطالعاتی در کشورمان درخصوص پراکندگی این ایزوله‌ها انجام گرفته است. این مطالعات گسترش ایزوله‌های MRSA را در نمونه‌های کلینیکی، بروز عفونت‌های بیمارستانی، بین پرسنل، پزشکان و بیماران بستری نشان می‌دهد<sup>۹-۱۴</sup>. در این راستا مطالعه‌ای که در سال گذشته در بیمارستان امام رضا (علیه‌السلام) کرمانشاه انجام گرفت که حاکی از آن است که ۲۸/۱۳٪ بیماران بخش همودیالیز حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی با منشأ بیمارستانی هستند. هم‌چنین فراوانی MRSA در بخش همودیالیز ۳۱٪ و در سایر بخش‌ها ۳۶/۶٪ تعیین شد. میزان مقاومت ایزوله‌های MRSA اکثراً بیش از MRSA بود و به‌ترتیب ۸۶٪ و ۹۵٪ از ایزوله‌های MRSA بخش همودیالیز و سایر بخش‌ها، گزارش شدند. این آمار نشان‌دهنده‌ی گسترش زیاد ایزوله‌های MRSA در بینی بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان است.

با توجه به مشکلات موجود درخصوص مقاومت‌های دارویی ایزوله‌های باکتریال و تأثیر آن بر کارایی درمان‌های تجربی و در ادامه‌ی مطالعات قبلی خود درخصوص مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم ایزوله‌های MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین به‌عنوان یکی از داروهای با ارزش در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی بررسی گردید. در مطالعه‌ی حاضر ۱۲۴ عدد از نمونه‌هایی که

در درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بالینی در جامعه ما می‌باشد، ولی از سوی دیگر در مطالعه‌ی ما فراوانی ایزوله‌های HVISA ۰/۹ درصد بود که شاید زنگ خطری برای مواجهه با ایزوله‌های مقاوم‌تر در آینده‌ی نزدیک در کشورمان باشد.

آنتی‌بیوگرام در آن‌ها انجام شد به سفوکسیتین مقاوم بودند. از آن تعداد ۸ نمونه به ونکومایسین مقاوم بودند اما علت این مقاومت در هیچ‌کدام ژن‌های VanB و VanA نبود. گرچه در این مطالعه سویه‌های VISA و VRSA مشاهده نشد و این امر یک یافته امیدوارکننده

## References

1. Adesoji AT, Onuh JP, Okunye O. Bacteria resistance to cephalosporins and its implication to public health. *J Bacteriol Mycol* 2016; 3: 1021.
2. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, et al. *Zinsser microbiology*. 20<sup>th</sup> ed. USA: Appleton and Hange; 1992: 411-8.
3. Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. Multiplex PCR detection of VanA, VanB, VanC-1, and VanC-2/3 genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 703-7.
4. Pe'richon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4580-7.
5. Fang H, Edlund C, Nord CE, et al. Selection of cefoxitin-resistant bacteroides the taiotaomicron mutants and mechanisms involved in b-lactam resistance. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 48-53.
6. Ploy MC, Francois B, Mounier M, et al. Nasal carriage of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* among intensive care unit staff. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1951.
7. Marshal J, Muhlemann K. Duration of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriage, according to risk factors for acquisition. *Infection Control and Epidemiology* 2006; 27: 1206-12.
8. Dinges M, Orwin P, Dchliever P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 16-34.
9. Saderi H, Owlia P, Zafarghandi N, et al. Evaluation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from nose of two teaching hospitals staff of Shahed University. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2004; 14: 69-75.
10. Soltani Arabshahi K, ForooheshTehrani H, Mahmood Arabi S. Vancomycin-resistant Entrococci in hospitalized patients. *RJMS* 2000; 6: 302-9.
11. Haddadi A, Moradi T, Mahdipour A, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* infections resistant to methicillin (MRSA) and vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) to determine the MIC with E-Test. *Journal of Faculty of Tehran University of Medical Sciences* 1390; 69: 344-51.
12. Ahmadi A, Soltandalal M., Poorshafi M, antimicrobial susceptibility testing and detection of resistance genes to vancomycin resistant enterococci isolated from sewage. *Journal of Medical Sciences* 1385; 3: 151-8.
13. Nikooei M, Meidani M, Khorvash F, et al. Evaluation of the frequency of phenotype and genotype of VanA and VanB genes in vancomycine resistant enterococcus isolated from clinical sample of Alzahra Hospitals in Isfahan. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16: 61-9.
14. Eshraghi SS, Talebi M, Pourshafie MR, Salari MH. The prevalence and molecular characterization of vancomycin resistant gram positive cocci isolated from patients in Tehran. *Iran J Med Microbiol* 2007; 1: 9-15.

## Evaluation of VanA and VanB genes in cefoxitin resistant Staphylococcus aureus causing skin infections in hospitalized patients in Razi Hospital, Tehran, using real time PCR method

Fahime Nemati, PhD<sup>1</sup>  
 Masome Mohammadzaki<sup>1</sup>  
 Safar Shamohammadi, MSc<sup>2</sup>  
 Zeinab Ghassemi, PhD<sup>2</sup>  
 Ebrahim Eskandari, MSc<sup>3</sup>

1. Faculty of New Sciences and Technologies, Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Dermatology, Razi Hospital, Tehran, Iran
3. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Background and Aim:** Staphylococcus aureus is the second cause of hospital acquired infections, and responsible for 80% of purulent infections, and majority of skin infections. About 30 to 50 percent of normal people carry staph in their nose or groin and armpits. VanA, VanB, VanC1, VanC2/C3, VanG, VanL, and VanX are genes responsible for encoding resistance to vancomycin, TychoPlanyn and Avoparcyn, among them vanBand vanAare the most common cause of resistance that could be located on a plasmid or a chromosome and can be transferred via conjugation. The aim of this study was to The aim of this study was to investigatethe role of VanA and VanB genes in Cefoxitin resistant Staphylococci aureuscausing skin infections in patients admitted to Razi Hospital in Tehran using real time PCR method.

**Methods:** The samples were collected from Khordad 1394 for one year in the Microbiology Department of the Clinical Laboratory of Razi Hospital. Exudative skin lesions were sampled by sterile swab and cultured on the blood agar and EMB medium. Then catalase, oxidase and coagulase tests were performed on the gram-positive cocci and the sensitivity to vancomycinin Cefoxitin-resistant Staphylococcus aureus was determined using the E-test method. The presence of vanAand vanBgenes were investigated by Real Time PCR.

**Results:** Out of 978 patients with infected skin lesions, 733 samples of Staphylococcus aureus were isolated. Of these, 124 were Cefoxitin resistant, among them 8 samples had a high response rate of 3, and 5had high response above 16. But VanA and VanB genes were not responsible for resistance in any of them.

**Conclusion:** Due to the development of resistant strains of Staphylococcus in skin and hospital infections, identification of its encoding genes are necessary in order to use appropriate antibiotics to reduce the course of treatment and the side effects of taking antibiotics.

**Keywords:** Staphylococcus, drug resistance, skin infection, cefoxitin, resistance genes

Received: May 21, 2017 Accepted: June 08, 2017

Dermatology and Cosmetic 2017; 8 (1): 22-26

**Corresponding Author:**  
 Fahime Nemati

Faculty of New Sciences and Technologies,  
 Azad University, Tehran, Iran  
 Email: f\_nemati82@yahoo.com

**Conflict of interest:** None to declare