مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۰، مهر ۱۳۹۵، صفحه ۵۲-۴۶

مقاومت کروموزومی به موپیروسین در سویه های استافیلوکوک اورئوس و تهیه نقشه برش آنزیمی AluI

رضا یاری(PhD)[۱*]، مارال خامه‌چی (MSc)[۲]، محمدرضا مهرابی (PhD)[۳]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد
۲-دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد
۳-گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

دریافت: ۹۵/۲/۸، اصلاح: ۹۵/۳/۱۲، پذیرش: ۹۵/۵/۶

خلاصه

سابقه و هدف: موپیروسین آنتی‌بیوتیک ترشحی و ممانعت‌کننده از عمل آنزیم ایزولوسین- tRNA سنتتاز باکتریایی است که علیه زرد زخم بکار می رود. موپیروسین به طور اختصاصی با آنزیم ایزولوسین- tRNA سنتتاز متصل و سنتز پروتئین را مهار می‌کند. هدف از این مطالعه تهیه سویه های استاندارد از باکتری استافیلوکوک اورئوس دارای نقشه برش معین و تایید شده ملکولی از ژن *iles-1* با کمک آنزیم AluI می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۱۵۰ سویه استافیلوکوک اورئوس از نمونه های بالینی پوست بیماران و کارکنان ۳ بیمارستان شهرستان قم از محیط انتقالی (BHI) (مرک-آلمان) بر روی محیط غنی بلاد آگار (مرک-آلمان) به روش استریک پلیت کشت داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. استفاده از روش های بیوشیمیایی و PCR ناحیه srRNA ۱۶ تایید هویت شدند. حضور ژن *iles-1* با استفاده از روش PCR بررسی و نقشه برش آنزیمی AluI انجام شد. همچنین برای نشان دادن مقاومت از دیسک ۵ µg موپیروسین استفاده گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد از ۱۵۰ نمونه ۷ سویه مقاوم به موپیروسین هستند. همچنین میزان آلودگی به سویه های مقاوم در زنان ۴۲/۵۸٪ و در مردان ۵۷/۱۴٪ می باشد. ۱۰۰٪ ایزوله‌های مقاوم به موپیروسین دارای PCR مثبت ژن مقاومت به موپیروسین کروموزومی *iles-1* بودند.

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه مقاومت سویه های استافیلوکوک به موپیروسین پائین است.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، موپیروسین، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهمترین گونه در جنس استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود (۱). از آنجایی که این باکتری دارای ژنوم انعطاف پذیری می‌باشد، سویه‌های بیماریزا و مقاوم به داروی آن گسترش یافته است (۳و۲). در سال های اخیر افزایش چشمگیری در بروز عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس که غالباً چند مقاومتی نیز می‌باشند مشاهده شده است (۵و۴). چرک‌زایی موضعی مشخص‌کننده عفونت استافیلوکوکی است. استافیلوکوک اورئوس با تغییرات چرک زایی در هریک از اندام‌ها باعث ایجاد یکسری بیماری از جمله پنومونی، اندوکاردیت، گاستروانتریت، استئومیلیت، سپتمی سمی می‌شود (۶-۸). در مطالعه Zeinalinia و همکاران از ۷۰ نفر حامل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، این تعداد ۸ باکتری جدا شده مقاوم به آنتی بیوتیک موپیروسین بودند (۹). در سال ۱۹۹۸ Schmitz و همکاران استافیلوکوکوس ها را در ۱۹ بیمارستان اروپا مطالعه کردند و دریافتند که شیوع مقاومت سطح بالای موپیروسین در استافیلوکوک اورئوس ۱/۶٪ و در CONS ۵/۶٪ بود (۱۰). در مطالعه ای که در سال ۷۴ بر روی ۱۰۰ نفر از پرسنل بیمارستان های شهر اراک انجام شد ۳۴ درصد پرسنل، ناقل استافیلوکوک اورئوس داخل بینی شناخته شدند (۱۱). یک تحقیق اپیدمیولوژیکی روی ایزوله های MRSA مقاوم به موپیروسین نشان داد که میزان مقاومت سطح بالای موپیروسین در بیمارستان های کانادا، از ۱/۶٪ در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۹ به ۷٪ در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۴ افزایش یافته است (۱۲). درمان صحیح، به موقع وکافی با آنتی‌بیوتیک مناسب گام مهمی در بهبود بیماری‌های عفونی است (۱۳). بیش از پنجاه سال است که از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سریع و موثر عفونت‌ها استفاده می‌گردد اما یکی از مسائل مهم در درمان بیماریهای عفونی، مقاومت باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۵و۱۴). اولین بار ایجاد مواد ضدمیکروبی توسط سودوموناس فلوئورسانس توسط Fuller و همکاران گزارش گردید که با مطالعات بعدی آنتی بیوتیک جدا شده به نام موپیروسین خوانده شد (۱۶). موپیروسین علیه زرد زخم حاصل از استرپتوکوکوس پیوژن و استافیلوکوک

این مقاله حاصل پایان نامه مارال خامه چی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر رضا یاری
آدرس: بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن:۰۶۶-۴۲۵۱۸۰۰۰
E-mail: rezayari@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

اورئوس در درمان عفونتهای پوستی بکار می رود (۱۷و۱۸). برای نخستین بار در سال ۱۹۸۶، موپیروسین بوسیله پزشکان برای بیماران تجویز و متعاقب مصرف بالینی آن، سوش‌های مقاوم سریعاً گزارش گردید (۱۹).

مقاومت به موپیروسین به دو صورت کروموزومی و پلاسمیدی وجود دارد و از لحاظ فنوتیپی به ۳ گروه تقسیم می شود: سطح پایین مقاومت دارای MIC ۸-۲۵۶ µg/ml است و با جهش نقطه‌ای در ژن کروموزومی iles-1= Isoleucine-tRNA ligase1 ایجاد می‌شود، سطح بالای مقاومت دارای MIC =Minimum Inhibitory Concentration، مساوی و بالاتراز ۵۱۲ µg/ml است و به کمک ژن *iles-2 (mupA)* پلاسمیدی ایجاد می‌شود و سطح بسیار بالای مقاومت دارای MIC بالای ۱۰۲۴ µg/ml است و به کمک ژن *mupB* پلاسمیدی ایجاد می‌شود(۲۲-۲۰).

در گذشته از ویژگی های فنوتیپی مختلفی مانند بیوتایپینگ، سروتایپینگ، باکتریوفاژ یا باکتریوسین تایپینگ و پروفایل حساسیت به آنتی بیوتیک جهت تایپینگ میکروب ها و دسته بندی عوامل عفونی استفاده شده. برخی از تکنیک های ملکولی که برای تایپینگ میکروارگانیسم ها بکار می‌روند عبارتند از: PFGE= Pulse Field Gel Electrophoresis، RFLP، آنالیز پلاسمیدی، ریبوتایپینگ، اسپولیگوتایپینگ، RAPD-PCR= Random Amplified Polymorphic DNA (PD:، Rep-PCR= Repeated sequences-PCR و ERIC-PCR= Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Sequence PCR. اخیراً برخی از محققین گزارش نمودند که تکنیک‌های مبتنی بر DNA، روشهای تایپ بندی مولکولی، PFGE و MLST= Multi Locus Sequence Typing روشهای کارآمدی در تایپ بندی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین هستند (۲۸-۲۳). در این بررسی حضور ژن *iles-1* در سویه های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از پوست با روش PCR مورد مطالعه قرار گرفت تا وجود سویه های مقاوم به موپیروسین مشخص شود.

هدف از این مطالعه تهیه سویه های استاندارد از باکتری استافیلوکوک اورئوس دارای نقشه برش معین و تایید شده ملکولی از ژن *iles-1* با کمک آنزیم AluI برای ثبت در مرکز کلکسیون میکروارگانیسم ایران (PTCC) به منظور استفاده سایر محققین و پژوهشگران داخلی و خارجی می باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جداسازی شده از نمونه‌های بالینی پوست بیماران و کارکنان ۳ بیمارستان شهرستان قم از محیط انتقالی (BHI) (مرک-آلمان) بر روی محیط غنی بلاد آگار (مرک-آلمان) به روش استریک پلیت کشت داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوک اورئوس با رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، تشخیص اولیه داده شد. سپس به کمک تست کوآگولاز، بیوشیمیایی افتراقی (DNA Agar، Mannitol Salt Agar و Urea Broth) (کندا-مادرید) (۲۹) و PCR ناحیه srRNA ۱۶ اقدام به شناسایی دقیق ایزوله‌ها شد.

روش دیسک دیفیوژن: برای تعیین الگوی مقاومت سویه های استافیلوکوک اورئوس، حساسیت نسبت به موپیروسین مطابق روش انتشار (۳۰) با استفاده از دیسک آنتی بیوتیکی µg ۵ موپیروسین (شرکت هایمدیا- هند) و با رعایت استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute=CLSI صورت گرفت. نمونه ها را در محیط مولر هینتون براث کشت داده و ۴ ساعت در دمای°C ۳۷ قرار گرفت. پس از رشد باکتری در محیط سوسپانسیونی با غلظت ۵/۰ مک فارلند تهیه شد. از این سوسپانسیون با استفاده از سواپ استریل به صورت سفره‌ای روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک آنتی بیوتیک موپیروسین روی محیط قرارگرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن آنها در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه‌گیری گردید. برای دیسک موپیروسین معیارها به صورت زیر بود: اگر هیچ هاله‌ای اطراف دیسک موپیروسین وجود نداشت سویه به عنوان سویه مقاوم به موپیروسین در نظر گرفته شد و در صورت وجود هاله اطراف دیسک موپیروسین به عنوان سویه حساس به موپیروسین در نظر گرفته شد (۳۱).

روش ملکولی PCR: برای استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA گرم مثبت شرکت سینا کلون استفاده شد. پس از تخلیص ژنوم باکتری به منظور شناسایی ژن *iles-1* از پرایمر iles-1A استفاده گردید (جدول ۱). برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (Biorad USA PCR T100) استفاده شد (جداول ۳ و ۲).

جدول ۱. توالی، ژن‌های هدف و پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق و وزن ملکولی محصول PCR حاصل از این پرایمرها

پرایمر	توالی از سمت '۵ به '۳	قطعه حاصل از PCR	منبع
iles1-A	F:gtaaatctttaggtaatgtgattgtac R:tcttctttaacatgtggtgtatgaga	bp ۵۴۱	۲۱

جدول ۲. چرخه دمایی-زمانی امپلیکون ژن *iles1-A*

Step	Temperature(°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	۹۵	۵(min)	۱
Denaturation	۹۵	۵۰(Sec)	
Annealing	۵۲	۵۰(Sec)	۳۴
Extension	۷۲	۱۲۰(Sec)	
Final extension	۷۲	۱۰(min)	۱

جدول ۳. مقدار مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر

ترکیبات	غلظت
ddH_2O(DW)	____
Buffer 10X	۱x
$MgCl_2$	۵/۱ mM
dNTP	۲/۰ mM
Primer	۶/۰ mM
Taq polymerase	۴/۰ U
DNA	۱۰-۴۰ng

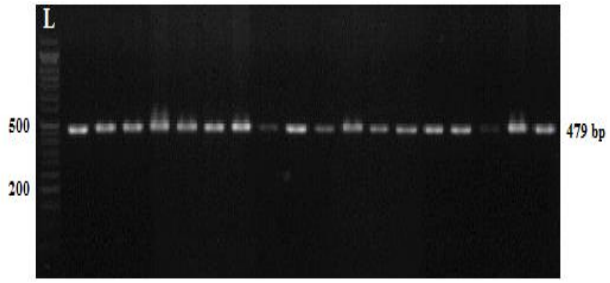
[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

بعد از اتمام واکنش، ۴ میکرولیتر از مخلوط PCR روی ژل آگارز ۵/۱ درصد حاوی رنگ DNA Safe Stain با استفاده از بافر ۵/۰x TBE به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۷۰ مورد الکتروفورز قرار گرفت و باند ایجاد شده به وسیله دستگاه ژل داک (E-BOX VILBER) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تخمین اندازه قطعه ها از نشانگر bp ۱۰۰ (Cat. No. PR۹۱۱۶۵۳ شرکت سینا کلون) استفاده شد.

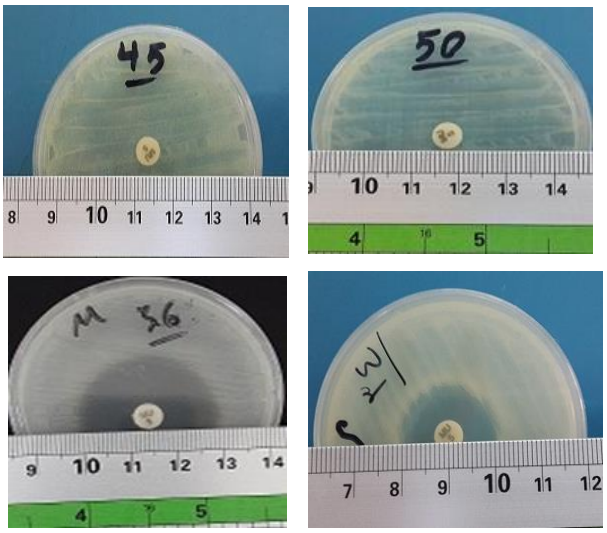
برش آنزیمی: به منظور برش آنزیمی نمونه‌های PCR از آنزیم AluI شرکت سیناکلون استفاده گردید(۳۵-۳۲). برای این منظور ابتدا دو محلول 10X RapidDigest Universal Buffer و 10X RapidDigest Blue Buffer را به ترتیب به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر و ۱۲۰ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط کردیم. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را همراه با ۳ میکرولیتر RapidDigest و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر در یک میکروتیوب ریخته و به آرامی مخلوط می کنیم. میکروتیوب را به منظور فعال شدن آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. بعد از گذشت زمان فعال سازی آنزیم به منظور غیر فعال کردن آنزیم میکروتیوب را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و پس از پایان زمان برش قطعات را با استفاده از ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز می کنیم.

یافته ها

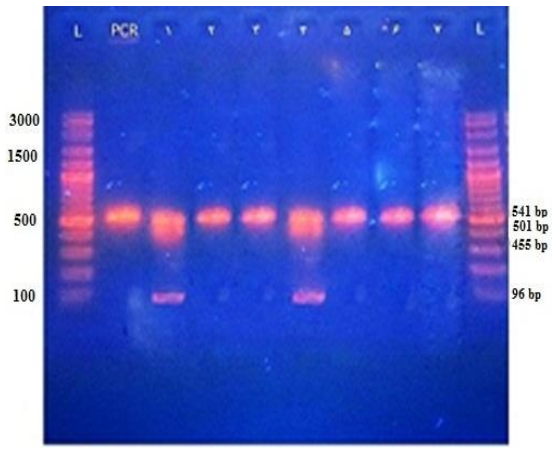
با آزمایش های تاییدی فنوتیپی و PCR ناحیه srRNA ۱۶ (شکل ۱)، هویت ۱۵۰ سویه به عنوان استافیلوکوک اورئوس تایید گردید. با روش دیسک دیفیوژن از بین ۱۵۰ سویه استافیلوکوک اورئوس ۷ سویه مقاوم به موپیروسین شناخته شدند و هیچ گونه هاله ای در اطراف دیسک موپیروسین دیده نشد (شکل ۲). از طرفی مشخص شد مقاومت به موپیروسین در مردان بیشتر از زنان است. ۱۰۰٪ ایزوله‌های مقاوم به موپیروسین دارای PCR مثبت ژن مقاومت به موپیروسین (کروموزومی) بودند و در تمام نمونه‌های مقاوم به موپیروسین امپلیکون مورد تکثیر با پرایمر ileS-1A از ژن *ileS-1* شناسایی شد(شکل ۳). بعد از انجام PCR نمونه ها با استفاده از آنزیم AluI برش داده شد. پس از برش با آنزیم AluI داده های حاصل از باندهای تولید شده به صورت ماتریس ۱ و ۰ وارد برنامه SPSS شد. داده‌ها به برنامه های MVSP ۳/۲۲= Multi Variate Statistical Package و NTSYS۲/۰۲= Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System منتقل گردید و از آن برای ترسیم دندروگرام و ماتریس تشابه استفاده شد (شکل ۴ و ۵).



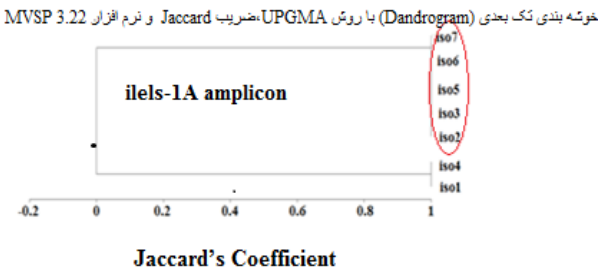
شکل ۱. ژل الکتروفورز امپلیکون حاصل از PCR ناحیه srRNA ۱۶، L: DNA مارکر (Cat. No. PR901633)



شکل۲. نمونه مقاوم (a و b) و غیر مقاوم (c و d) استافیلوکوک اورئوس به آنتی‌بیوتیک موپیروسین در بررسی با روش دیسک دیفیوژن



شکل ۳. ژل الکتروفورز برش امپلیکون حاصل از PCR با آنزیم AluI، آگارز ۲٪، محصولات چاهک های شماره ۱ و ۴ توسط آنزیم برش خورده و در bp ۴۵۵ ،bp ۹۶ و bp ۵۰۱ باند تشکیل شده L: DNA مارکر(Cat. No. FER SM1153)



شکل ۴. دندروگرام ۷ ایزوله ماوم به موپیروسین با روش UPGMA(UPGMA: Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean Averages) و ضریب Jaccard امپلیکون ileS-1A ژن *ileS-1*

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

Similarity Matrix

	iso1	iso2	iso3	iso4	iso5	iso6	iso7
iso1	1.000						
iso2	0.316	1.000					
iso3	0.316	1.000	1.000				
iso4	1.000	0.316	0.316	1.000			
iso5	0.316	1.000	1.000	0.316	1.000		
iso6	0.316	1.000	1.000	0.316	1.000	1.000	
iso7	0.316	1.000	1.000	0.316	1.000	1.000	1.000

شکل ۵. ماتریس تشابه ۷ ایزوله در بررسی الگوی برش امپلیکون bp ۵۴۱ امپلیکون iles-1A ژن *iles-1* توسط آنزیم AluI

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج دندروگرام مشخص شد که ژنوتایپینگ ژن *iles-1* با استفاده از نقشه برش امپلیکون iles-1A با آنزیم AluI به خوبی نمونه‌های بالینی اخذ شده از بیماران (۷–۵و۳و۲) بجز نمونه ۳ را از نمونه‌های کارکنان بیمارستان جدا نموده است. همچنین نمونه‌های جمع آوری شده از افراد مذکر این مطالعه (۷–۵ و۲) به خوبی در خوشه‌ای مجزا از سایر نمونه ها طبقه بندی شده اند و نمونه‌های افراد مونث (۴و۳و۱) نیز بجز نمونه ۳ در خوشه ای مجزا از سایر نمونه ها در یک خوشه قرار گرفته‌اند. نمونه های ۱ و ۴ که در یک خوشه قرار گرفته اند تشابه ژنتیکی بالایی با یکدیگر دارند و از آنجایی که نمونه ۱ از بیمارستان کامکار و نمونه ۴ از بیمارستان شهید بهشتی گرفته شده به احتمال زیاد عامل انتشار آلودگی آنها یکی است.

از طرف دیگر نمونه های ۲، ۳، ۵، ۶ و۷ با یکدیگر تشابه ژنتیکی بالایی دارند و از آنجایی که این نمونه ها از بیمارستان های کامکار و نکوئی (هدایتی) است باز این احتمال وجود دارد که عامل انتشار آلودگی آنها یکی باشد. در مطالعه Zeinalinia و همکاران از بین ۲۶۱ نمونه جمع‌آوری شده مشخص شد که ۷۰ نفر حامل استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند که از این بین ۸ سویه مقاوم به موپیروسین بودند (۹).

شیوع این مقاومت نسبت به این مطالعه کمتر بود چون درصد مقاومت در ۱۵۰ ایزوله مورد مطالعه حاضر ۶۶/۴ درصد گزارش شد. در بررسی Saderi و همکاران ۹۴ سویه تائید شده به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روشهای فنوتیپی ۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به موپیروسین شناسایی شد (۳۶). در مطالعه حاضر در ۷ ایزوله ژن *iles-1* کروموزومی که مسئول مقاومت پایین است شناسایی گردید. در مطالعه Saderi در بین سویه‌های مقاوم، سویه‌های دارای مقاومت بالا نسبت به سویه‌های دارای مقاومت پایین درصد بالاتری به خود اختصاص دادند ولی در مطالعه Orrett و همکاران مقاومت سطح پایینتر سهم بیشتری به خود اختصاص داده بود و این به دلیل ایجاد جهش کروموزمی در ژن *iles-1* در مطالعات آنها است (۳۷).

مقاومت به موپیروسین به ۳ حالت وجود دارد حالت اول ژن مقاومت در ژن *iles-1* باشد (مقاومت پایین) حالت دوم اینکه ژن مقاومت در پلاسمید *mupA* باشد (مقاومت بالا) و حالت سوم اینکه ژن مقاومت در پلاسمید *mupB* وجود داشته باشد (مقاومت بسیار بالا) با این وجود باکتری ممکن است که هیچ یک از ژن‌های مقاومت را نداشته باشد ولی باز هم به موپیروسین مقاوم باشد و علت آن ژن های کد کننده Efflux pump، تغییر در نفوذ پذیری غشاء، غیر فعال ساختن آنزیم و یا تغییر شیمیایی باشد (۳۸). در این مطالعه از آنزیم AluI برای برش استفاده گردید چون آنزیم AluI نسبت به سایر آنزیم‌ها برش های کمتری ایجاد می‌کند در نتیجه مناطقی را که شناسایی می‌کند از هم فاصله دارند که باعث می‌شود تشخیص باندهای ایجاد شده دقیقتر و راحتتر باشد. نتایج به خوبی تایپینگ ایزوله‌ها را با کمک بررسی برش آنزیمی با نمونه افراد بیمار و سالم و نیز افرد مذکر از مونث را انجام داده است.

با این وجود پیشنهاد می‌گردد که از تعداد نمونه‌های مقاوم به موپیروسین بیشتری در مطالعات ژنوتایپینگ استفاده شود همچنین از آنزیم های دیگری نیز برای برش استفاده شود تا نتایج دقیق تری بدست آید. میزان شیوع استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به موپیروسین در ایران نسبتاً پایین بوده به همین علت نگرانی جدی وجود ندارد. اما رعایت بهداشت ضرورت دارد. همچنین ژنوتایپینگ ژن *iles-1* به خوبی توانست نمونه های اخذ شده از بیماران و کارکنان و همچنین افراد مذکر و مونث را از یکدیگر جدا کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی سلولی ملکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

Evaluation of Mupirocin Chromosomal Resistance in Staphylococcus Aureus Strains and Mapping of Alui Enzymatic Digestion

R. Yari (PhD)*[1], M. Khamehchi (MSc)[2], M.R. Mehrabi (PhD)[3]

1.Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University of Borujerd , Borujerd, I.R.Iran.

2.Azad Islamic University, Borujerd Branch, Borujerd, I.R.Iran

3.Department of Laboratory Sciences, Medical Faculty, Islamic Azad University of Borujerd, Borujerd, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 18(10); Oct 2016; PP: 46-52

Received: Apr 27th 2016, Revised: Jun 1st 2015, Accepted: Jul 27th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Mupirocin is a secretory antibiotic and a bacterial Isoleucine- tRNA synthetase enzyme inhibitor which is used against impetigo. Mupirocin specifically binds to Isoleucine-tRNA synthetase enzyme and inhibits protein synthesis. The aim of this study was to prepare standard strains of Staphylococcus aureus with a designated and approved molecular genetic map from iles-1 gene using AluI enzyme.

METHODS: In this cross-sectional study, 150 clinical strains of Staphylococcus aureus isolated from skin samples of patients and staff in three hospital of Qom, from transfer medium (BHI) (Merck, Germany) on blood agar medium (Merck, Germany) using streak plate method and cultured for 24 to 48 hours and were incubated at 37°C. Using biochemical and PCR methods, srRNA 16 area was validated. Presence of Iles-1 gene was considered using PCR and mapping of AluI enzymatic digestion was carried out. Also 5ug mupirocin disk was used to investigate bacterial resistance.

FINDINGS: The results showed that from150 samples, 7 samples are mupirocin resistant strains. The rate of infection with resistant strains in women was 42.58% and men 57.14%, respectively. 100% of resistant isolates to mupirocin had a positive PCR for iles-1 gene of resistant to chromosomal mupirocin.

CONCLUSION: It is concluded that mupirocin resistant strains of Staphylococcus aureus is few.

KEY WORDS: *Staphylococcus Aureus, Mupirocin, Polymerase Chain Reaction*.

Please cite this article as follows:

Yari R, Khamehchi M, Mehrabi MR. Evaluation of Mupirocin Chromosomal Resistance in Staphylococcus Aureus Strains and Mapping of Alui Enzymatic Digestion. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(10):46-52.

* **Corresponding Author: R.Yari (PhD)**

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Borujerd Branch of Islamic Azad University, Borujerd, I.R.Iran

Tel: +98 66 42518000

Email: rezayari@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]

[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

References

1.Tyhoo M, Mobin H, Mozafari NA, Moadab SR, Sedigh Bayan kh, Mones Rast SH. The prevalence of toxin shock syndrome oxin (TSST-1) producing clinical isolates of staphylococcus aureus strains isolated from shohada hospital in tabriz, Iran. Laborator J .2011;5(1):2-8. [In Persian]

2.Kluytmans J, Belkum AV, Verbrugh H. Nasal Carriage of Staphylococcus aureus: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. Clin Microbiol .1997;10(3):505-20.

3.Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. J Microb World . 2014;6(4):299-311. [In Persian]

4.Molla Abaszadeh H, mobin H, mirzaee H. Determine the prevalence of antibiotic resistance patterns in Staphylococcus aureus strains isolated from the patients Emam Reza and Tabriz Shohada Hospital. J Environment Microb Technol Islamic Azad Univ. 2011;3(9):45-50. [In Persian]

5.Karamstji A, Moradi N, Bushehri A, Jahed M, Dadsetan B, Sangin abadi F, et al. Nasal carrier rates and antibiogrm pattern of staphylococcus aureus strains isolated from hospital staff in teaching hospitals in Bandar Abbas. Hormozgan Med J. 2008;12(2):95-101. [In Persian]

6. Brooks GF, Morse S, Carroll KC, Mietzner TA, Butel JS. Javetz, Melinc & adelberg's medical microbiology. 24th ed.United States: Aeej Publication; 2008.P. 269-77.

7.Imani Fooladi AA, Riazipour m, Sattari M. Molecular and serological detection of enterotoxigenic staphylococcus aureus from traditionally dairy products. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010;11(4):19-26. [In Persian]

8.Pournajaf A, Ardebili A, Ghaemi EA, Omidi S, Borhani K, Khodabandeh M, et al. Identification of clinical methicillin and mupirocin-resistant staphylococcus aureus by multiplex-PCR. J Med Bacteriol. 2014;3(1-2):52-9.

9.Zeinalinia N, Pourmand MR, Ghane M, Afrough P, Hosseini M, Abdossamadi Z. Frequency of Colonization with Staphylococcus aureus among healthcare workers of Tehran University of Medical Sciences hospitals. Hospital. 2011;10(1):71-6. [In Persian]

10.Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices?. Int J Antimicrob Agents. 1997;9(1):1-19.

11.Sarmadian H, Didgar F, Abtahi H. The comparison of topical nasal mupirocin and single dose of oral ciprofloxacin in treatment and reinfection of staphylococcus aureus carriers in Arak personnel of Vali-e-asr hospital 2004. J Arak Univ Med Sci .2008;11(1):1-7. [In Persian]

12.Seah C, Alexander DC, Louie L, Low DE, Longtin J, Melano RG. MupB, a new high-Level mupirocin resistance mechanism in staphylococcus aureus. Antimicrob Ag Chemother. 2012;56(4): 1916-20.

13.Molazade A, Gholami MS, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Ashraf Mansuri J, et al. Evaluation of antibiotic resistance pattern of isolated gram-negative bacteria from urine culture of hospitalized patients in different wards of vali-asr hospital in Fasa during the years 2012 and 2013. J Fasa Univ Med Sci. 2014;4(2):1-9. [In Persian]

14.Eslami G, Taheri S, Naalchi F, Baseri N, Samadi R, Azarghashb A. Study of bacteria causing skin infections and antibiotic resistance in patients referred to Shohada and Loghman hospitals. Res Med. 2013;36(4):205-10. [In Persian]

15.Sedighian F, Sanee A, Alaodolehei H, Arshi M, Rekabipour Kh. Antibiotic resistance of microorganisms isolated in Yahya Nejad Hospital in Babol 2007. Laboratory Sci Mag. 2009;2(2):7-1. [In Persian]

16.Fuller AT, Mellows G, Woolford M, Banks GT, Barrow KD, Chain EB. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by Pseudomonas fluorescens. Nature.1971; 234(5329):416-7.

17.Ramsey MA, Bradley SF, Kauffman CA, Morton TM. Identification of chromosomal location of mupA Gene, encoding low-level mupirocin resistance in Staphylococcal isolates. Antimicrob Age Chemoth. 1996;40(12):2820-3.

18.Udo EE, Jacob LE, Mathew B. Genetic analysis of methicillin–resistant Staphylococcus aureus expressing high - and low - level mupirocin resistance. J Med Microbiol. 2001;50(10):909-15.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]

19.Ghobadi nejad M. Antimicrobial Multi-resistance staphylococci and gene transferring in bacteria. J Babol Univ Med Sci. 2002;5(1):55-67. [In Persian]
20.Hesami S, Hosseini D, Eskandari S, Ghaznavi-Rad E, Amouzandeh-Nobaveh A. Phenotypic and genotypic determination of mupirocin resistance among methicillin susceptibility and resistance in staphylococci isolated from nosocomial infections. J Mazand Univ Med Sci. 2014;23(1):30-9. [In Persian]
21.McNeil JC, Hulten, K. G, Kaplan SL, Mason EO. Mupirocin Resistance in Staphylococcus aureus Causing Recurrent Skin and Soft Tissue Infections in Children. Antimicrob Age Chemoth. 2011; 55(5): 2431-3433.
22.Godbeer MS, Gold RM, Lawhon SD. Prevalence of mupirocin resistance in staphylococcus pseudintermedius. J Clin Microbiol. 2014;52(4):1250-2.
23.Farahani N, Mirnejad R, Ahmadi Z, Amirmozafari N, Masjedian F. Molecular typing of acinetobacter baumannii clinical strains in tehran by pulsed-field gel electrophoresis. J Fasa Univ Med Sci. 2012;2(4):259-65. [In Persian]
24.Khalafian H, Momtaz H. Typing of the Shiga toxin – Producing Escherichia coli strains isolated from diarrheic children using Multi Locus Sequence Typing (MLST). Iran J Med Microbiol. 2015;9(1):14-21.[In Persian]
25.Reisi M, Tajbakhsh E, Momtaz H. Coagulase gene polymorphism of Staphylococcus aureus isolated from clinical respiratory system infections in Shahrekord. J Microb World. 2014;7(3):206-13. [In Persian]
26.Ranjbar R, Mirzaie A, Sadeghifard N, Jonaidi N. Molecular typing of salmonella infantis clinical strains isolated in tehran. J Military Med. 2014;16(1):17-22. [In Persian]
27.Zaker Bostanabadi S, Jabarzadeh A, pourazar sh, Ghalami M. Typing of mycobacterium tuberculosis isolated from patients in the tehran city by spoilgotyping. New Cell Molecul Biotechnol J. 2011;1(2):6-1. [In Persian]
28.Rafee tabatabaei R, poorbakhsh A, Jalali Z. The study of different methods of typing for diagnosis and differentiation of E. coli strains isolated from urinary tract infections. J Sci Islamic Azad univ. 2009;74(1):1-14. [In Persian].
29.Macfaddin JF. Biochemical Tests For Identification Of Medical Bacteria. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000; PP:4-10.
30.McFarland J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J Am Med Ass. 1907;14:1176-8.
31.Alder J, Farraro MJ, Hindler JA, Patel JB, Zimmer BL, Hecht DW, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013;33(1): 3-76.
32.Wilson GG,Wang H, Heiter DF, Lunnen KD. Restriction Enzymes in Microbiology, Biotechnology and Biochemistry. Encuentro .2012; 39: 19-48.
33.Pingoud A, Jeltsch A. Structure and Function of type II Restriction Endonucleases. Nucleic Acid Res . 2001;29(18):3705-27.
34.Nafisi MR, Alipour Shadbad M, Karimi A, Rahimian GA, Imani Fooladi A. PCR and RFLP of ureC (glmM) gene for identification and typing of Helicobacter pylori strains isolated from gastric biopsy specimens of gastric patients. Kowsar Med J .2009:14(3):143-8. [In Persian]
35.Nahavandi Iraqi A, Seifi M, Dezfulian M, Jabbarzadeh E. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA). J Infect Dis Trop Med. 2013; 18(63): 5-11. [In Persian]
36.Saderi H, Owlia P, Habibi M. Detection of resistance to mupirocin in staphylococcus aureus strains isolated from patients in four university hospitals of tehran by polymerase chain reaction (pcr) method. Shahed J Sys. 2009; 16(78):31-8. [In Persian]
37.Orrett FA. The emergence of Mupirocin Resistance among Clinical Isolates of Methicillin Resistance Staphylococcus aureus in Trinidad: a First Report. Jpn J Infect Dis. 2008;61(2):107-10.
38. Najar Pirayeh Sh, Esmaeili D. Antibiotic efflux pumps. Annal Milit Health Sci Res. 2004; 2(1):301-6. [In Persian]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.10.7.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.10.46]