

شناسایی مولکولار ژنهای عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ها و متی سیلین در نمونه های بالینی استافیلوکوک اورئوس

محمد بکائیان (PhD)^۱، حامد طهماسبی (MSc)^{۲*}

۱-مرکز تحقیقات بیماری های عفونی-گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

دریافت: ۹۵/۳/۲، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۹/۶

خلاصه

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت در جامعه و بیمارستان می باشد. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بواسطه آنزیم های خاصی ایجاد می شود که توسط ژن هایی که توانایی گردش بین سویه ای توسط عناصر ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزونها را دارا می باشند، کد می شوند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی حضور ژنهای (2'')Ie/aph(6')aac، IIIa1-Ia1(4')ant به همراه ژن mecA است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، ۱۱۳ ایزوله استافیلوکوک اورئوس از ۵۷۹ نمونه مختلف بالینی جداسازی شد. برای تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین از روش تعیین حداقل غلظت مهارتی با نوارهای E-test اوگزاسیلین استفاده شد. شناسایی ژنهای (2'')Ie/aph(6')aac، IIIa1-Ia1(4')ant و mecA با استفاده از روش PCR، انجام شد. همچنین ارتباط حضور ژنهای آمینوگلیکوزیدی و ژن mecA نیز بررسی گردید.

یافته ها: از ۱۱۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس که با تست های فوتیمی تایید شده بودند، ۵۳ ایزوله (۴۶/۹۱٪) دارای ژن mecA، ۴۳ ایزوله (۳۸/۰۵٪) دارای ژن (2'')Ie/aph(6')aac، ۱۹ ایزوله (۱۶/۸۱٪) دارای ژن IIIa1-Ia1(4')ant و ۲۲ ایزوله (۱۹/۴۷٪) دارای ژن ant(4')-Ia1 بودند. همچنین بین حضور ژن مقاومت به متی سیلین و ژنهای عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ارتباط معنی داری بدست آمد. این در حالی بود که بین نوع نمونه های جدا شده و حضور ژنهای مقاومت نیز در برخی موارد ارتباط معنی داری مشاهده شد ($p \leq 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که استفاده مکرر از آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به همراه آنتی بیوتیک های بتا لاکتامی می تواند زمینه ظهور سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به چند آنتی بیوتیک (MDR) را فراهم کند. با تجویز مناسب و کنترل شده آنتی بیوتیک ها می توان از بیشتر شدن این مقاومت ها و ظهور سویه های دارای مقاومت چندگانه، جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، آمینوگلیکوزید، مقاومت دارویی، مقاومت به متی سیلین.

مقدمه

سطح دنیا را آلوده به این باکتری گزارش کرد(۸). در سال ۱۹۶۱، نخستین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) شناسایی گردید که به سرعت در سراسر جهان منتشر شد و بعد از مدت کوتاهی نه تنها به متی سیلین مقاوم شدند بلکه در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر مقاومت کردند(۹و۱۰). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین کسب شده از بیمارستان(HA-MRSA) در مدتی کوتاه به جامعه نیز راه پیدا کردند و سبب ظهور سویه های CA-MRSA شدند(۱۱). مقاومت نسبت به متی سیلین ناشی از حضور ژن mecA است که بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک و بزرگ به نام Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) است(۱۲). این واحد شامل مجموعه ای از ژنهای تنظیمی (mecI، mecR)

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزای بیمارستانی می باشد که دارای قابلیت های بالقوه ای در ایجاد طیف گسترده ای از عفونت ها می باشد (۱). بیماری های وابسته به این باکتری می تواند از یک عفونت پوستی ساده تا پنومونی نکروزه کننده، تا بیماری های پوستی مانند سندرم فلسی شدن پوست و سندرم شوک سمی استنومیلیت، عفونتهای ادراری و حتی مسمومیت های غذایی انسان را درگیر کند(۵و۲). درمان عفونت های با منشا استافیلوکوک اورئوس و استفاده وسیع از آنتی بیوتیک های مختلف سبب بروز سویه های مقاوم در این باکتری شده است (۷و۶). از جمله سویه هایی که دهه ۸۰ میلادی گسترگی بسیار فراوانی پیدا کرد، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین می باشد بطوریکه سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۹۹۰ تا سال ۲۰۰۰ بیش از ۱۲۰ هزار بیمارستان در

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی به شماره ۷۱۵۲ دانشگاه علوم پزشکی زاهدان می باشد.

*مسئول مقاله: حامد طهماسبی

آدرس: زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۵۴-۳۳۲۹۵۷۶۵

E-mail: h.tahmasebi87@yahoo.com

پرونده بیمار) در بیمارستان بستری و مشکوک به عفونت های باکتریایی بودند وارد مطالعه شدند و در صورت عدم عفونی بودن بیماری با زمینه باکتریایی از مطالعه خارج شدند. نمونه های بدست آمده بعد از کشت اولیه، توسط آزمایش های بیوشیمیایی تعیین جنس و گونه شدند. در نهایت ۱۱۳ ایزوله استافیلوکوک اورئوس بعد از انجام آزمایشات افتراقی بدست آمد.

تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین و آمینوگلیکوزید با MIC E-test
استافیلوکوک اورئوس: مقاومت به متی سیلین بواسطه تعیین حداقل مهارتی (MIC) با استفاده از نوارهای E-test اوگزاسیلین (Himedia) تعیین شد. برای تعیین مقاوم آمینوگلیکوزیدی هم از نوارهای E-test جنتامایسین و آمیکاسین مطابق با روش بالا استفاده شد. نتایج بدست آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 و استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان سویه های کنترلی استفاده شد (۲۴).
تعیین الگوی مقاومتی به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوک اورئوس: برای تعیین الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی از دیسک های آنتی بیوتیکی جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) و نیتیل مایسین (۱۰ میکروگرم) بروش دیسک دیفیوژن استفاده شد (همگی Himedia هند). جهت این کار بعد از تهیه پلیت های حاوی MHA (Merck آلمان) دیسک ها را با استفاده از پنس استریل در کنار شعله روی محیط قرار داده و در دمای ۳۷°C بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. قطر هاله های ایجاد شده با استفاده از CLSI مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

استخراج ژنومی با استفاده از کیت استخراج: کلنی های بدست آمده از کشت ۲۴ ساعته به ۵ میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی برات (Merck آلمان) که قبلاً درون لوله های درب دار شیشه ایی به تعداد ایزوله ها تقسیم و شماره گذاری شده بودند، تلقیح شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ ساعت انکوبه گردید. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن ایران بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA بدست آمده در دمای ۲۰-درجه سانتیگراد برای انجام آزمونهای مولکولی، ذخیره شد.

آماده سازی پرایمر ها و انجام PCR: جهت انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر از MasterMise (شرکت Ampliqon آلمان) (شامل، ۳mMMgCl₂, (NH₄) SO₄, Tris-HCl PH8.5, 0/4MmdNTP, 0/2%Tween20, Ampliqon polymeras 0/2 unit, Insert red dye and stabilizer) استفاده شد. حجم باقیمانده با آب مقطر دیونیزه جبران شد.

پرایمرهای "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" و "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" با طول ۴۵ جفت باز برای تکثیر aac(6')Ie/aph "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" و "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" با طول ۲۴۲ جفت باز برای ژن aph(3')-IIIa1 "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" و "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" با طول ۱۹۵ جفت باز برای ژن ant(4')-Ia1 و از پرایمرهای "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" و "5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3" استفاده شد.

و cassette chromosome (ccr)recombinase (mecC) و (۱۳). امروزه یکی از بهترین گروه آنتی بیوتیکی برای درمان سویه های MRSA آمینوگلیکوزیدها می باشد که حتی با داشتن عوارض جانبی گسترده، اثر بخشی مطلوبی را در درمان عفونت های استافیلوکوکی دارند (۱۴و۱۵). گاهی برای افزایش اثر بخشی این آنتی بیوتیک ها، از آنتی بیوتیک های بتالاکتامی و گلیکوپپتیدی درکنار آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی استفاده می شود (۱۶). آمینوگلیکوزیدها با اتصال به زیر واحد ۳۰S ریبوزومی سبب قطع مکانیسم ترجمه باکتری شده و اثرات ضدباکتریایی خود را اعمال می کنند (۱۶).

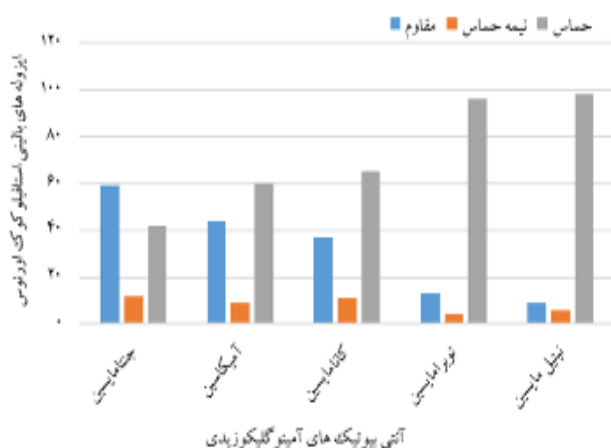
مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها ناشی از حضور آنزیم هایی است که تغییراتی در آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی ایجاد می کند (۱۷). این آنزیم ها توسط ژن های متعددی از قبیل (2") Ie / aph (6 ') - IIIa1.aac (4) - ant Ia1 - (کد می شوند که از توانایی گردش بین سویه ای توسط عناصر ژنتیکی متحرک مانند ترانسپوزونها را دارا می باشند) (۱۴). سه آنزیم AAC(6')/APH(2"), ANT(4') و APh(3')-IIIa که به ترتیب توسط ژنهای aac(6')-Ie/aph(2"), ant(4')-Ia و aph(3')-IIIa رمز می شوند جزء شایعترین آنزیم های تغییردهنده در گونه های مختلف استافیلوکوکی می باشند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند (۱۸و۱۹). هر یک از این آنزیم ها مقاومت به آنتی بیوتیک خاصی را کد می کند به مقاومت نسبت به جنتامایسین، کانامایسین و توبرامایسین ناشی از فعالیت آنزیم (2") Ie / aph (6 ') - aac، مقاومت نسبت به نئومایسین، توبرامایسین، آمیکاسین ناشی از حضور ژن رمزکننده Ia1 - ant (4') - و آنزیم aph (3') - IIIa1 باعث ایجاد مقاومت نسبت به کانامایسین و توبرامایسین می شود (۱۹و۱۶). برای شناسایی فنوتیپی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی باید از طیف مناسبی از آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی از جمله جنتامایسین، کانامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین استفاده کرد (۲۱).

به دلیل عدم استفاده از طیف مناسب دیسک های آنتی بیوتیکی مناسب در شناسایی اولیه سویه های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، و حساسیت پایین روش های فنوتیپی، تشخیص دقیق و سریع سویه های مقاوم یکی از مشکلات اصلی عدم درمان بموقع سویه های عفونت زای مقاوم می باشد (۲۲و۲۳). یکی از بهترین و حساس ترین راه ها برای تشخیص سویه های مقاوم، ردیابی ژن های مسئول توزیع آنزیم های عامل مقاومت توسط روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) می باشد. این مطالعه با هدف شناسایی مولکولار ژنهای عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ها و متی سیلین در نمونه های بالینی استافیلوکوک اورئوس صورت گرفت که در کنار تعیین فنوتیپی سویه های مقاوم و حضور ژنهای ant(4')-Ia1, aph(3')-IIIa1, aac(6')Ie/aph(2") به همراه ژن mecA نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری ها: در این مطالعه مقطعی، با کد کمیته اخلاق ir.zaums.rec.1394.250 با استفاده از روش نمونه گیری آسان و در دسترس، طی یک دوره ۱۱ ماهه ۵۹۷ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، مایع مغزی-نخاعی، سواپ بینی، زخم، ترشحات، ترشه، خلط، بزاق و سایر از بیماران بستری در بخش های مختلف مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در بازه زمانی خرداد تا دی ماه سال ۱۳۹۴ جمع آوری شد. بیمارانی که به مدت طولانی (با توجه به

بر اساس نمونه های بالینی، بیشترین میزان ژن ها از نمونه های زخم و ادرار و خون جداسازی شدند که از بیماران بخش های اطفال، ICU و بیماران مراجعه کننده بصورت سرپایی گرفته شده بودند (جدول ۱). ارتباط معنی داری بین حضور ژن های عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ها و ژن *mecA* مشاهده شد. علاوه براین بین حضور برخی نمونه ها و حضور ژنهای عامل مقاومت به آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی و آمینوگلیکوزیدی رابطه معنی داری وجود داشت. بطوریکه بین ایزوله های جدا شده از نمونه های خون، زخم و ادرار، با فراوانی ژنهای آمینوگلیکوزیدی موجود، ارتباط معنی داری مشاهده شد ($p \leq 0.011$)، ($p \leq 0.041$)، ($p \leq 0.039$).



نمودار ۱. توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی

3 و 5'-GAAGTACGCAGAAGAG-3 برای تکثیر ژن *mecA* با طول ۵۴۴ جفت باز استفاده شد. برای تکثیر ژن های مورد مطالعه ترموسایکلر BioRad MJ Mini (آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. سیکل های دمایی برای واسرشتگی اولیه در 95°C به مدت ۳ دقیقه، سپس 35°C چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در 95°C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها بمدت ۴۵ ثانیه برای ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* در دمای 56°C و برای ژنهای *aph(3')-IIIa1* و *ant(4')-Ia1* در دمای 52°C در نظر گرفته شد. تکثیر اولیه هم به مدت ۴۰ ثانیه در دمای 72°C لحاظ گردید. برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱۰ دقیقه از دمای 72°C استفاده شد. در این ژامون از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 هم بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

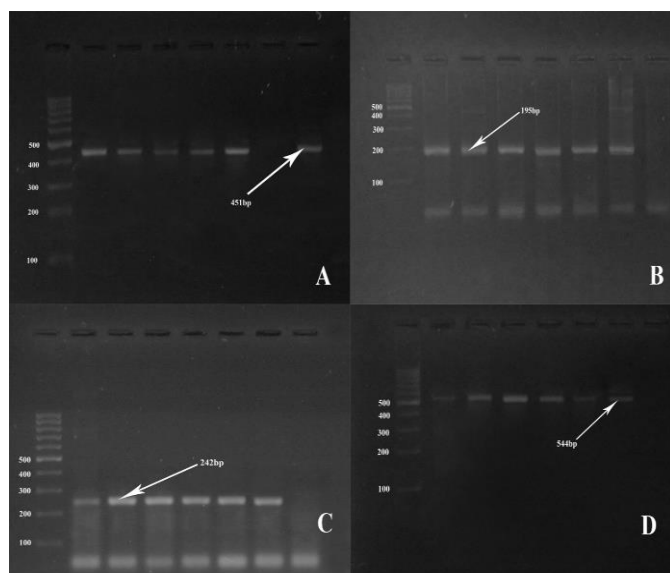
الکتروفورز روی ژل اگارز ۱٪/۵ درصد: ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۳ درصد در بافر $\times 0.5$ الکتروفورز گردید. از مارکر bp ۱۰۰ فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. آزمون PCR بعنوان گلداستاندارد برای مقایسه با سایر نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها: نتایج بدست آمده از تعیین مقاومت های آنتی بیوتیکی بروش فنوتیپی با استفاده از نرم افزار WHONet نسخه ۵/۵ مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد. همچنین از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری X^2 برای بررسی حضور یا عدم حضور ارتباط بین برخی متغیرها استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این بررسی که بر روی نمونه های مختلف بالینی استافیلوکوک اورئوس انجام شد، ۳۶ ایزوله (۲۳٪) از کشت ادرار، ۵ ایزوله (۴/۴٪) از مایع مغزی نخاعی، ۱۴ ایزوله (۱۲/۳۸٪) از سوپ بینی، ۱۹ ایزوله (۱۶/۸۱٪) از زخم، ۱۰ ایزوله (۱۱/۳٪) از کشت خون، ۸ ایزوله (۷/۰۷٪) از خلط، ۱۱ ایزوله (۹/۷٪) از کاتتر، ۳ ایزوله (۲/۶٪) از ترشحات و ۱۷ ایزوله (۱۵/۴۰٪) هم از سایر نمونه های بالینی جداسازی شد که بیشترین نمونه های جمع آوری شده از بیماران مونت بدست آمد. از ۱۱۳ ایزوله بدست آمده، ۶۱ ایزوله (۵۳/۹۸٪) با استفاده از تعیین حداقل غلظت مهاری توسط نوارهای E-test اوگزاسیلین مقاوم به متی سیلین تشخیص داده شدند. علاوه بر این براساس نتایج بدست آمده از تعیین حداقل غلظت های مهاری نوارهای E-test برای مشخص کردن ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی، ۵۵ ایزوله (۴۸/۶۷٪) دارای مقاومت به چنتامایسین و ۴۹ ایزوله (۴۳/۳۶٪) دارای مقاومت به آمیکاسین بودند.

براساس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی از ۱۱۳ ایزوله، بیشترین مقاومت مربوط به چنتامایسین و آمیکاسین بود و کمترین مقاومت هم آنتی بیوتیک توبرامایسین از خود نشان داد (نمودار ۱). براساس آزمون PCR از ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در غربالگری اولیه، ۵۳ ایزوله (۴۶/۹۱٪) دارای ژن *mecA* بودند. علاوه بر این، ۴۳ ایزوله (۳۸/۵۱٪) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2'')*، ۱۹ ایزوله (۱۶/۸۱٪) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲۲ ایزوله (۱۹/۴۶٪) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند (شکل ۱). از نظر فراوانی ژنها



شکل ۱. A: انجام PCR بر روی ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* با طول ۴۵۱ جفت باز. B: انجام PCR بر روی ژن *ant(4')-Ia1* با طول ۱۹۵ جفت باز. C: انجام PCR بر روی ژن *aph(3')-IIIa1* با طول ۲۴۲ جفت باز. D: انجام PCR بر روی ژن *mecA* با طول ۵۴۴ جفت باز. چاهک ۵: کنترل مثبت استافیلوکوک اورئوس ATCC43300. چاهک ۶: کنترل منفی سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک های ۴ تا ۶: نمونه های مثبت از نظر حضور ژن

جدول ۱. فراوانی حضور ژنهای *mecA* و *ant(4')-Ia1*, *aph(3')-IIIa1*, *aac(6')Ie/aph(2'')*

در ایزوله های بالینی اورئوس بر اساس نمونه های بالینی جدا شده				
استافیلوکوک اورئوس	<i>mecA</i> (n=۵۳)	<i>aac(6')Ie/aph(2'')</i> (n=۴۳)	<i>aph(3')-IIIa1</i> (n=۱۹)	<i>ant(4')-Ia1</i> (n=۲۲)
نوع نمونه	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
خون	۵(۹/۴)	۳(۶/۹)	۲(۱۰/۵۲)	۰
ادرار	۱۳(۲۴/۵۲)	۹(۲۰/۹۳)	۵(۳۱/۲۶)	۷(۳۱/۸۱)
کاتاتر	۵(۹/۴)	۱(۲/۳)	۵(۳۱/۲۶)	۰
زخم	۸(۱۵/۰۹)	۷(۱۶/۲۷)	۳(۱۵/۷۸)	۴(۱۸/۱۸)
ترشحات	۳(۵/۰۶)	۰	۰	۰
خلط	۲(۳/۷)	۱(۲/۳)	۰	۰
سواب بینی	۱۱(۲۰/۷۴)	۹(۲۰/۹۳)	۱(۵/۲۶)	۴(۱۸/۱۸)
مایع مغزی-نخاعی	۴(۷/۵)	۰	۰	۱(۴/۰۳)
سایر موارد	۵(۹/۴)	۱۳(۳۰/۲۳)	۳(۱۵/۷۸)	۶(۲۷/۲۷)

بحث و نتیجه گیری

هیچگونه همخوانی نداشت. در این مطالعه میزان مقاومت به توبرامایسین و نیتیل مایسین بیش از ۳۰ درصد گزارش شده است که از مقدار بدست آمده در مطالعه ما بیشتر می باشد (۲۹). Hammerberg و همکاران در انگلیس، نشان دادند که ارتباط معنی داری بین مقاومت های آمینوگلیکوزیدی و مقاومت به متی سیلین وجود دارد (۳۲). علاوه بر این مطالعات متعددی که در سطح دنیا انجام گرفته صحت این موضوع را کاملاً اثبات می کند. بطوریکه در مطالعات دیگر نیز ارتباط میان مقاومت به متی سیلین و مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی نشان داده شده است (۳۳-۳۴).

به علاوه مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مورد استفاده در این مطالعه در ایزوله های MSSA مشاهده نگردید. نتایج بدست آمده از آزمایشات مولکولی هم نشان داد که در ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* بالاترین میزان فراوانی را داشت. این امر نشان دهنده حضور ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* بعنوان مهمترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (۳۵ و ۳۶). از ۱۱۳ ایزوله استافیلوکوک اورئوس ۵۳ ایزوله (۴۶/۹۱٪) دارای ژن *mecA* عامل مقاومت به متی سیلین بودند. از این میان از ۵۳ ایزوله مقاوم به متی سلین ۴۳ ایزوله دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* ۱۹ ایزوله دارای *IIIa1-aph(3')* و ۲۲ ایزوله دارای ژن *Ia1-ant(4')* بودند.

از مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی ژن های عامل مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی می توان دریافت که بیشترین شیوع ژنی مربوط به ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* و بعد از آن ژن *IIIa1-aph(3')* می باشد. این نتایج در مطالعات Shokravi و همکاران و Malek Hosseini و همکاران گزارش شده است. در صورتی که در این مطالعه ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* بالاترین فراوانی را دارد. اما بعد از ژن *ant(4')-Ia1* با شیوع ۲۴/۷۷ درصدی از نظر فراوانی جایگزین *IIIa1-aph(3')* با شیوع ۱۱/۵۰ درصدی شده است که با مطالعات ذکر شده همخوانی ندارد (۲۱ و ۳۰).

از نظر فراوانی ژن ها بر اساس نمونه های بالینی بیشترین میزان ژن ها از نمونه های زخم و ادرار و خون جداسازی شدند که از بیماران بخش های اطفال، ICU و بیماران مراجعه کننده بصورت سرپایی گرفته شده بودند که در مطالعات Bhatt و همکاران در هند و Butin و همکاران در فرانسه همخوانی دارد بطوریکه در این مطالعات تعدد نمونه های گرفته شده از بخش های مراقبت های ویژه بسیار بالا گزارش شده اند (۳۷ و ۳۸). در مطالعه ای که توسط Temiz و همکاران

در مطالعه حاضر طیف بسیار گسترده ایی از نمونه های بالینی بدست آمده، از کشت ادرار بودند که نشان دهنده شیوع این باکتری در بروز عفونت های ادراری است. بعد از کشت ادرار، کشت خون و سواب بینی بیشترین موارد را به خود اختصاص دادند. از مجموع ۱۱۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس بدست آمده از نمونه های مختلف، در غربالگری اولیه توسط نوارهای E-test اوگزاسیلین برای تعیین سوبه های مقاوم به متی سلین، ۶۱ ایزوله (۵۳/۹۶٪) استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) تشخیص داده شدند. همچنین ۵۵ ایزوله (۴۸/۶۷٪) استافیلوکوک اورئوس، مقاوم به آمینوگلیکوزیدها بودند. این درحالی است که از این ۵۵ ایزوله مقاوم به آمینوگلیکوزید ۵۳ ایزوله دارای مقاومت به متی سیلین بودند که از این نظر با مطالعه Shokravi و همکاران و همخوانی دارد (۲۱).

Ardic و همکاران هم در ترکیه نشان دادند که بیشترین میزان شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک های اورئوس دارای مقاومت به متی سیلین می باشد (۲۵). از طرفی نتایج حاصل از تعیین الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به جنتامایسین بود که ۵۹ ایزوله (۵۲/۲۱٪) را به خود اختصاص داد از این نظر با نتایج بدست آمده توسط Glad و همکاران در کویت (۲۶) و Abdal و همکاران در قم (۱۶) و Ghotaslou و همکاران در تبریز (۲۷) همخوانی داشته و با مطالعه Rahimi و همکاران در اصفهان همخوانی نداشت و میزان مقاومت به جنتامایسین و کانامایسین بالاتر از مواردی بود که در این مطالعه مشاهده شد (۲۸).

آمیکاسین و کانامایسین هر کدام با ۳۸/۹۳٪ و ۳۲/۷۴٪ به ترتیب بعد از جنتامایسین بیشترین مقاومت را نشان دادند. Sattari و همکاران در تهران، Malek Hoseyni و همکاران در اهواز در مطالعه خود نشان دادند که مقاومت آنتی بیوتیکی به مراتب بیشتر از مطالعه حاضر گزارش شده است (۲۹ و ۳۰). این چنین تفاوتی که در برخی موارد در گزارشات گوناگون از مناطق مختلف دیده می شود را می توان به تغییر سوبه متناسب با موقعیت جغرافیایی نسبت داد. به طوریکه در مطالعه ای که توسط Shmitz و همکاران در اروپا انجام شد، شیوع فنوتیپی مقاومت به جنتامایسین و آمیکاسین را بیش از ۳۰ درصد گزارش کرده بودند که با این مطالعه کاملاً تفاوت دارد (۳۱).

توبرا مایسین و نیتیل مایسین از دیگر آنتی بیوتیک هایی بودند که به ترتیب ۱۳ ایزوله (۱۱/۵۰٪) و ۲۸ ایزوله (۲۴/۷۷٪) به آنها مقاومت داشتند. این نتایج نیز با نتایج بدست آمده از مطالعات Malek Hoseyni و همکاران مطابقت داشت (۳۰). علاوه بر این با نتایج بدست آمده در مطالعه Sattari و همکاران

می توان با اصلاح الگوی تجویز آنتی بیوتیک و عدم استفاده از آنتی بیوتیکهای متنوع در امر درمان، مانع انتقالات ژنتیکی شد. همچنین می توان به این نتیجه دست یافت که مصرف آنتی بیوتیک های مختلف از کلاس های گوناگون، بصورت همزمان، می تواند زمینه ظهور سویه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک (MDR) را سبب شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان جهت حمایت مالی از این تحقیق، از آقای جواد ادبی به دلیل کمک در انجام مراحل تشخیصی جدایه ها و همچنین از مسئولین فنی آزمایشگاه بیمارستان علی ابن ابی طالب زاهدان به ویژه خانم ریگی و مظاهری به دلیل همکاری ایشان در جمع آوری نمونه ها، تشکر و قدردانی می گردد.

ترکیبه انجام شد، فراوانی ژن های (2") aph / Ie (6') aac در حدود ۷ درصد و فراوانی ژن IIIa1 - (3') aph هم حدود ۱۰ درصد گزارش شدند که از مقادیر بدست آمده در مطالعه حاضر کمتر می باشند (۳۹). Choi و همکاران نیز در مطالعه ای در کره جنوبی انجام دادند، فراوانی ژن های / Ie (6') aac Ia1 - (4') - ant IIIa1 - (3') aph, aph (2") را به ترتیب ۸۳، ۲۱ و ۴۲ درصد که از نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر بیشتر می باشد (۳۶). اختلاف های موجود در نتایج بدست آمده از پژوهش های مختلف را می توان به شرایط جغرافیایی متفاوت، خصوصیات منحصر به فرد ژنوتیپ باکتری ها، بخش و محلی که نمونه از آن جدا شده و همچنین نوع نمونه بدست آمده نسبت داد. یکی از مهمترین عواملی که شیوع مقاومت های آنتی بیوتیکی خصوصا آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی را در مطالعه حاضر با سایر مطالعات متفاوت کرده، شیوه، میزان و مدت زمان مصرف متفاوت آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مورد استفاده می باشد که زمینه ساز این تفاوتها شده است.

Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of *Staphylococcus Aureus*

M. Bokaeian (PhD)¹, H. Tahmasebi (MSc)^{*2}

1.Infectious Diseases & Tropical Research Center, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran

2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(3); Mar 2017; PP: 38-46

Received: May 22th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Nov 26th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of infection in the hospital and the community. Resistance to aminoglycosides is caused by certain enzymes, which are coded by the genes with the ability of intrastrain circulation by mobile genetic elements such as transposons. This study aims to determine the frequency of aac (6') Ie / aph (2''), aph (3') - IIIa1, ant (4') - Ia1 genes along with mecA gene.

METHODS: In this cross sectional study, 113 *Staphylococcus aureus* strains were isolated from 579 various clinical samples. The Method of determining the minimum inhibitory concentration was used to identify the genes resistant to aminoglycosides by Oxacillin Etest strips. PCR method was used to identify aac (6') Ie / aph (2''), aph (3') - IIIa1, ant (4') - Ia1 and mecA. The relationship between aminoglycosides and mecA genes was also investigated.

FINDINGS: Of 113 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* confirmed by phenotypic tests, 53 isolates (46.91%) had mecA gene, 43 isolates (38.05%) had aac (6') Ie / aph (2'') gene, 19 isolate (16.81%) had aph (3') - IIIa1 gene and 22 isolates (19.47%) had ant (4') - Ia1 gene. In addition, there was a significant relationship between the presence of Methicillin-resistant gene and genes responsible for resistance to aminoglycosides. Meanwhile, there was also a significant relationship between the type of isolated samples and the presence of resistance genes in some cases ($p \leq 0/005$).

CONCLUSION: Results of the study demonstrated that frequent use of the aminoglycoside antibiotics along with beta-lactam antibiotics might provide the context for the emergence of multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* (MDR) strains. By appropriate and controlled administration of antibiotics, we can decrease such resistances and prevent the emergence of multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, Aminoglycosides, Drug Resistance, Methicillin Resistance.

Please cite this article as follows:

Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of *Staphylococcus Aureus*. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(3):38-46.

***Corresponding author: H. Tahmasebi (MSc)**

Address: Medical Microbiology Department, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, I.R.Iran

Tel: +98 54 33295465

E.mail: h.tahmasebi87@yahoo.com

References

1. Rafati MRAF, R% A Nemati-Hevelai, A. Chabra, A. Determination of frequency and antibiotic resistance of common bacteria in late onset sepsis at the neonatal ward in booali-sina hospital of Sari, Iran. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(6):64-71.[In Persian].
2. Dabrera G, Vickers A, Conaglen P, Evlampidou I, Lamagni T, Shetty N, et al. Risk factors for fatality in panton-valentine leukocidin-producing staphylococcus aureus pneumonia cases, England, 2012-2013. J Infect. 2014;69(2):196-9.
3. Oosthuysen WF, Orth H, Lombard CJ, Sinha B, Wasserman E. Population structure analyses of Staphylococcus aureus at Tygerberg Hospital, South Africa, reveals a diverse population, a high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes, and unique local methicillin-resistant S. aureus clones. Clin Microbiol Infect. 2014;20(7):652-9.
4. Barry PJ, Isalska BJ, Jones AM. Panton-valentine leukocidin-positive staphylococcus aureus: a potentially significant pathogen in cystic fibrosis. Paediatr Respir Rev. 2014;15(1):22-5.
5. Arabestani MR, Rastiany S, Mousavi SF, Ghafel S, Alikhani MY. Identification of toxic shock syndrom and exfoliative toxin genes of Staphylococcus aureus in carrier persons, resistant and susceptible methicillin. Tehran Univ Med J. 2015;73(8):554-60.[In Persian].
6. Calazans-Silva AC, Medeiros PT, Araujo DM, Carvalho BO, Coelho IS, Coelho SM, et al. Genetic analysis of mecA gene and detection of homologue pbpD in Stahylococcus sciuri group. Braz J Microbiol. 2014;45(2):651-5.
7. Khoddami EAJ, AA. Oxacillin resistant Staphylococci isolated from patients and personnel in Babol hospitals, 2000. J Babol Univ Med Sci. 2001;3(4):43-6.[In Persian].
8. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2008;46(5):344-9.
9. Bell AG, Coombs GW, Cater B, Douglass C. First report of a mecA-positive multidrug-resistant staphylococcus pseudintermedius isolated from a dog in New Zealand. New Zea Veterin J. 2016;6(4):1-4.
10. Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JM, Winkler M, et al. First report of multiresistant, mecA-positive Staphylococcus intermedius in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. Veter Dermatol. 2007;18(6):412-21.
11. Dash N, Panigrahi D, Al Zarouni M, Yassin F, Al-Shamsi M. Incidence of community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying pantone-valentine leucocidin gene at a referral hospital in United Arab Emirates. APMIS. 2014;122(4):341-6.
12. Valsesia G, Rossi M, Bertschy S, Pfyffer GE. Emergence of SCCmec type IV and SCCmec type V methicillin-resistant Staphylococcus aureus containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators?. J Clin Microbiol. 2010;48(3):720-7.
13. Kong LY, Jean A, Wong H, Semret M, Frenette C, Simor AE, et al. Bacteremia caused by a mecA-positive oxacillin-susceptible staphylococcus aureus strain with inducible resistance. Diagnos Microbiol Infect Dis. 2015;83(4):377-8.
14. Zuo GY, Han ZQ, Hao XY, Han J, Li ZS, Wang GC. Synergy of aminoglycoside antibiotics by 3-benzylchroman derivatives from the chinese drug caesalpinia sappan against clinical methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA). Phytomed. 2014;21(7):936-41.
15. Kalantar MAH, Gh% A Kalantar, H% A Asadi, A Goudarzi, M. Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Lavandula Officinalis L. on Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Rats. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(7):62-7.
16. Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive staphylococcus aurous and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. koomeh. 2014;16(1):82-9.[In Persian].

17. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, McTavish SM, et al. Combinations of beta-lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Plos one*. 2015;10(2):0117664.
18. Fujimura S, Tokue Y, Takahashi H, Nukiwa T, Watanabe A. Specificity of 4"-acetylation by an aminoglycoside-modifying enzyme in arbekacin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tohoku J Exp Med*. 1998;186(1):67-70.
19. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol*. 2008;56(6):558-62.
20. Hamdad F, Donda F, Lefebvre JF, Laurans G, Biendo M, Thomas D, et al. Detection of methicillin/oxacillin resistance and typing in aminoglycoside-susceptible methicillin-resistant and kanamycin-tobramycin-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Micro Drug Resist*. 2006;12(3):177-85.
21. Shokravi Z, Mehrad L, Ramazani A. Detecting the frequency of aminoglycoside modifying enzyme encoding genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioimpacts*. 2015;5(2):87-91.
22. Hotta K, Ishikawa J, Ishii R, Saitoh F, Kira K, Arakawa Y, et al. [Necessity and usefulness of detection by PCR of *mecA* and *aac(6')/aph(2'')* genes for identification of arbekacin-resistant MRSA]. *Japan J Antibio*. 1999;52(8):525-32.
23. Zareii BAS, T% A Movahedi, R% A Cheraghi, J% A Ebrahimi, S. Antibacterial Effects of Plant Extracts of *Alcea Digitata* L, *Satureja Bachtiarica* L. and *Ferulago Angulata* L. *J Babol Univ Med Sci*. 2014;16(1):31-7.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
25. Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. *Inter J Antimicrob Age*. 2005;26(3):331-346.
26. Glad T, Klingenberg C, Flaegstad T, Ericson JU, Olsvik O. Rapid detection of the methicillin-resistance gene, *mecA*, in coagulase-negative *Staphylococci*. *Scandinavian J Infec Dis*. 2001;33(7):502-6.
27. Ghotaslou R, Aghazadeh M, Ahangarzadeh Rezaee M, Moshafi MH, Forootanfar H, Hojabri Z, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes among coagulase negative staphylococci in Iranian pediatric patients. *J Infect Chemother*. 2014;20(9):569-73.
28. Rahimi E. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian J Microbiol*. 2013;44(2):393-399
29. Sattari M. Prevalence of ant Ia gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using Multiplex-PCR method. *Modar J Med Sci: Pathobiol*. 2009;12(1):59-68.
30. Malek Hosseini AA, Khoramrooz S, Marashifard M, Parhizgari N, Mansouri F. Frequency of the Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Hospitalized Burn Patients. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2016;25(134):147-57.[In Persian].
31. Shmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 1999;4(3): 253-9.
32. Hammerberg O, Elder D, Richardson H, Landis S. Staphylococcal resistance to aminoglycosides before and after introduction of amikacin in two teaching hospitals. *J Clin Microbiol*. 1986;24(4):629-32.
33. 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.
34. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol Res*. 2006;161(1):49-54.

35. Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, et al. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(5):701-5.
36. Choi SM, Kim S-H, Kim H-J, Lee D-G, Choi J-H, Yoo J-H, 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.
37. Butin M, Rasigade JP, Martins-Simões P, Meugnier H, Lemriss H, Goering RV, et al. Wide geographical dissemination of the multiresistant *Staphylococcus capitis* NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(1):46-52.
38. Bhatt P, Tandel K, Singh A, Mugunthan M, Grover N, Sahni AK. Species distribution and antimicrobial resistance pattern of Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care centre. *Med J Arm Forc India*. 2016;72(1):71-4.
39. Temiz M, Duran N, Duran GG, Eryılmaz N, Jenedi K. Relationship between the resistance genes to quaternary ammonium compounds and antibiotic resistance in staphylococci isolated from surgical site infections. *Med Sci Monit*. 2014; 20: 544-50.