مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۱۲، آذر ۱۳۹۶، صفحه ۳۵-۲۸

شناسایی و تعیین ارتباط آلل های کاست ccr با مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین

مهسا وفایی فر (Msc)[۱]، محمد یوسف علیخانی (PhD)[۱]، حامد طهماسبی (Msc)[۲]، محمد رضا عربستانی (PhD)[۳*]

۱-گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۲-گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۳-مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

دریافت: ۹۶/۲/۲۴، اصلاح: ۹۶/۷/۲۲، پذیرش: ۹۶/۸/۶

خلاصه

سابقه و هدف: مقاومت به متی سیلین و حضور کاست ژنی *ccr* در استافیلوکوک اورئوس، زمینه ظهور سویه های مقاوم به متی سیلین را فراهم کرده است. هدف از این مطالعه شناسایی آللهای کاست *ccr* در سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و تعیین ارتباط حضور این کاستها با فرایند چندمقاومتی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی، ۱۳۵ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین براساس نوع عفونت های ایجاد شده جداسازی و با دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم و ژن *mecA* تایید شدند.کاست ژنی *ccr* با پرایمرهای اختصاصی به روش Multiplex PCR بر روی ژن های *ccrA/B1*، *ccrA/B2*، *ccrA/B3*، *ccrA/B4*، *ccrA2/B*،*ccrC* موردشناسایی قرارگرفت.

یافته‌ها: از ۱۳۵ سویه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به پنی سیلین و اریترومایسین با فراوانی بیش از ۹۰ درصد اختصاص داشت. به ترتیب در ۲ ایزوله(۱/۳ درصد) برای ژن *ccrA/B1*، ۱۲ ایزوله (۸/۲ درصد) برای ژن *ccrA/B2*، ۱۵ ایزوله (۱۰/۳۴ درصد) برای ژن *ccrA/B3*، ۲ ایزوله (۱/۳ درصد) برای ژن *ccrA/B4*، ۴ ایزوله (۸/۲ درصد) برای ژن *ccrA2/B* و ۲۲ ایزوله (۱۵/۸۷ درصد) برای ژن *ccrC* مثبت بودند. ارتباط معنی داری بین حضور این ژنها و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد (p=۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: کاست ژنی *ccr* می تواند زمینه مقاومت به آنتی بیوتیک های کلاس های مختلف در سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: مقاومت دارویی، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین.

مقدمه

در سال ۱۹۶۱ مقاومت به پنی سیلین به طور کامل گسترش پیدا کرد و تا جایی پیش رفت که این باکتری علاوه بر پنی سیلین به داروهای دیگری از جمله متی سیلین، نفی سیلین و اوگزاسیلین و طیف گسترده ای از گروه های آنتی بیوتیکی دیگر مانند فلوروکوئینولونها، مقاوم شد(۲و۱). در این بین متی سیلین یکی از مهمترین آنتی بیوتیکهایی بود که برای درمان از آن استفاده شد و زمینه سازی ظهور یک عصر جدید را در مقاومت به متی سیلین را رقم زد(۴و۳). متی سیلین از جمله آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی می باشد که با اتصال به PBPs باعث مهار ترانس پپتیدازها، ممانعت ازساخت پپتیدوگلیکان باکتری و بدنبال آن تخریب دیواره سلولی می شود و در نهایت مرگ باکتری را در پی دارد (۵). مصرف متی سیلین بعد از گذشت مدتی در استاف اورئوس ایجاد مقاومت کرد و عامل پدید آمدن نسلی جدید از استاف اورئوس به نام استاف اورئوس مقاوم به متی سیلین(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)MRSA شد (۶). حضور ژن *mecA* منجر به بروز *استافیلوکوک اورئوس* های مقاوم به متی‌سیلین می شود (۷). حضور برخی کاست های ژنی در باکتری استافیلوکوک اورئوس، می تواند علاوه بر اینکه مقاومت های بتالاکتامی، از قبیل متی سیلین را رقم می زند، سبب ظهور برخی سویه هایی شود که به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مختلف مقاومت دارند. یکی از مهمترین کاست های ژنی استافیلوکوک اورئوس، کاست ژنی *ccr* می باشد (۸). *ccr* یک کدکننده ریکامبیناز می باشد که توسط المنتی متحرک در سویه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین کد می‌شود و سبب پایه ریزی مبنای طبقه بندی *SCCmec* شده است. حضور مشترک این توالی ها بر روی این المنت متحرک ژنتیکی که در سال ۱۹۹۱توسط Ito و همکاران مورد شناسایی قرار گرفت، سبب اجماع مجموعه‌های *SCCmec* و *ccr* در یک توالی متحرک شده اند(۹). همین امر زمینه شکل گیری انواع *ccr* و *SCCmec* در گونه های مختلف استافیلوکوک را رقم زده است. ریکامبیناز تولید شده توسط ccr می تواند باعث تحرک این کاست در ژنوم *استافیلوکوک اورئوس* شود، همچنین این آنزیم سبب فعالیت ورود/ خروج در محل

▣ این مقاله حاصل طرح هیئت علمی با شماره ۹۵۱۰۱۴۵۹۶۲ دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر محمدرضا عربستانی
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۷۷
E-mail:mohammad.arabestani@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

orfX از ناحیه ۵ می شود(۱۰). این مجموعه عظیم ژنی در حال حاضر بصورت کامل شناسایی نشده است، اما بطور کلی شامل سه گروه مختلف از جمله *ccrA* ، *ccrB* و *ccrC* می باشد. یکی از ویژگی های توالی ccr گروه بندی باکتری *استافیلوکوک اورئوس* براساس آلوتایپ های متفاوت و یا مشابه می باشد. *ccA* و *ccrB* که تاکنون بیشترین آلوتایپ (۴ آلوتایپ) را به خود اختصاص داده اند، در توالی و هویت نوکلئوتیدی دارای اختلافاتی هستند (۱۱).

اختلاف در مشابهت های نوکلئوتیدی سبب پیدایش اختلاف و یا مشابهتهای آلوتایپی در گونه های مختلف استافیلوکوک می شود. وجود بیش از ۸۵ درصد مشابهت نوکلئوتیدی سبب دسته بندی *ccr* براساس آلوتایپ‌های مشابه می‌شود و مشابهت ۶۰تا ۸۰درصدی نیز سبب دسته بندی *ccr* براساس آلوتایپ‌های غیر مشابه در یک جنس می شود (۱۲). *ccrC* در *استافیلوکوک اورئوس* دارای بیش از ۸۷ درصد شباهت نوکلئوتیدی می باشد که سبب بوجود آمدن آلوتایپ های مشابه در سویه های این گونه شده است. برای طبقه بندی کردن سویه های مقاوم به متی سلین استافیلوکوک های اورئوس براساس *ccr* باید از نامگذاری های مشترک براساس حضور یا عدم حضور یک یا چند *ccr* در سویه های مورد مطالعه استفاده کرد (۱۳).

این احتمال می رود که سویه های دارای مقاومت چندگانه (MDR) *استافیلوکوک اورئوس* که علاوه بر پنی سیلین و متی سیلین به برخی آنتی بیوتیک های وسیع الطیف مقاوم شده اند، المنت های ژنی را توسط کاست ژنی *SCCmec* منتقل کنند. این در حالی است که ظهور مقاومت به متی سیلین علاوه بر حضور کاست ژنی *SCCmec* نیاز به حضور *ccr* و همچنین نواحی J می باشد. در این بین کاست ccr به دلیل تنوع ساختاری و ژنتیکی خود، در سویه های مقاوم‌تری ممکن است مشاهده شود. علاوه بر این، قرار گیری لوکوس های ژنی *SCCmec* و *ccr* در کاست *SCC* می تواند زمینه ظهور سویه های دارای مقاومت چندگانه را رقم بزند (۱۳و۱۲).

از این رو مطالعه بر روی پروفایل های مقاومتی و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در حضور یا عدم حضور کاست ccr می تواند شناسایی سویه های دارای مقاومت چند دارویی را تسریع بخشد. لذا هدف از این مطالعه شناسایی آلل‌های کاست *ccr* در سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و تعیین ارتباط حضور این آلل‌ها با فرایند چندمقاوتی می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی- تحلیلی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد۹۵۱۰۰۷۵۷۵۷ در سال ۱۳۹۵ بصورت نمونه گیری آسان و در دسترس انجام شد. ۵۱۰ نمونه بالینی مختلف از بیماران بستری در بخش های مختلف به مراکز منتخب درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان (بیمارستان های سینا، بعثت، بهشتی) طی ۹ ماه جمع آوری شد. بیماران بستری بیش از دو هفته و مشکوک بودن آنها به عفونت های باکتریایی وارد مطالعه شدند. با استفاده از تست های بیوشیمیایی کاتالاز، کوگولاز، تخمیر مانیتول و DNA از استافیلوکوک اورئوس جداسازی شد. جهت تایید جنس و گونه های جداسازی شده از ژن *nucA* استفاده گردید(جدول۱). در نهایت از ۵۱۰ ایزوله بالینی جمع آوری شده، ۲۶۹ ایزوله استافیلوکوک اورئوس بدست آمد(۸). برای تعیین حساسیت ایزوله های بالینی از دیسک های آنتی بیوتیکی اریترومایسین ۱۵ میکروگرم، پنی سیلین ۱۰ واحدی، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرمی، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرمی، آمیکاسین ۳۰ میکروگرمی، سفازولین ۳۰ میکروگرمی، جنتامایسین ۱۰ میکروگرمی، نورفلوکساسین ۱۰میکروگرمی و سیپروفلوکساسین ۱۵ میکروگرمی با روش Kirby-Bauer Disk Diffusion استفاده گردید (شرکت Mast انگلستان) (۱۷).

برای این کار ابتدا کلنی های جداسازی شده از باکتری های بدست آمده تا بعد از حل کردن در سرم فیزیولوژی و تهیه رقت نیم مک فارلند، بصورت چمنی بر روی محیط های مولر هینتون آگار (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلیمتر کشت داده شد. سپس دیسکهای آنتی بیوتیکی با استفاده از دستگاه دیسپنسر (شرکت Mast آلمان) بر روی محیط چیده شد. بعد از آن، بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. مقاومت به متی سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین دیسک (۳۰ میکروگرمی) تعیین گردید.

نتایج بدست آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از *استافیلوکوک* اورئوس ATCC25923 کنترل منفی *استافیلوکوک اورئوس* ATCC43300 بعنوان منترل مثبت استفاده شد (۱۱). برای انجام استخراج DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن ایران استفاده شد. جهت آماده سازی ایزوله ها برای استخراج ابتدا ایزوله های بالینی تایید شده روی محیط بلاد آگار با ۵درصد خون گوسفند، ساب کالچر داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس مراحل استخراج DNA ژنومی براساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. (۱۸).

پرایمرهای تهیه شده (جدول ۱) از شرکت ماکروژن به سفارش پیشگام ایران برای شناسایی ژنهای *ccrA/B1*، *ccrA/B2*، *ccrA/B3*، *ccrA/B4*، *ccrA2/B*، *ccrC* و *mecA* مورد استفاده قرار گرفت. حجم واکنش در ۲۵ میکرولیتر که شامل ۲میکرولیتر از DNA الگو، ۱میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۱۲/۵میکرولیتر از MasterMixe(Ampliqon آلمان) (شامل Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mMMgcl_2,0/2%Tween20 ،0/4MmdNTP ،0/2 unit Ampliqon polymeras Insert red dye and stabilizer) استفاده شد. حجم باقیمانده با آب مقطر دیونیزه به حجم مورد نظر رسانده شد.

برای تکثیر ژن‌های مورد مطالعه ترموسایکلر Eppendorf 5331 (ساخت آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. سیکل های دمایی برای واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۵درجه بمدت ۶۰ثانیه، اتصال آغازگرها بمدت ۹۵ ثانیه، تکثیر اولیه هم بمدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱۰دقیقه از دمای ۷۲درجه سانتیگراد لحاظ گردید. در این بررسی از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC43300 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 هم بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده از روش های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. همچنین آزمون آماری کای-دو برای مقایسه یافته های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسه یافته های کمی مورد استفاده قرار گرفتند و $p\leq ۰/۰۵$ معنی دار در نظرگرفته شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

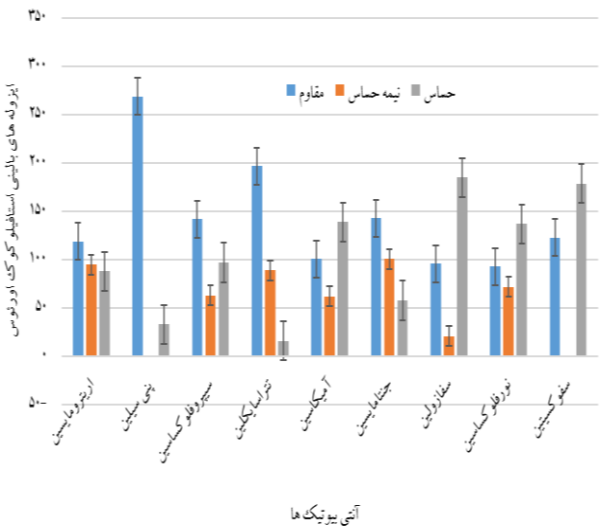
جدول۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی سویه های استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین و دارای فاکتورهای چسبندگی

ژنهای مورد بررسی	توالی نوکلئوتیدی	طول امپلیکون	منبع
ccrA/B1	CTT TCA CGA TAG ACA CAG TAA AAG AAG TTC ATA GCC GTT AAA TTG G	۱۰۲۲	(۱۴)
ccrA/B2	GCA TTC ATC ATC AAT CAA AAT G CTA TAA CCT TCT GTG CTT TGC A	۹۶۲	(۱۴)
ccrA/B3	TCC GTA ATA AGA AGC AAC TTC AC ACT ATA GCC TTC AGT ACT TTG GA	۷۰۶	(۱۴)
ccrA/B4	TGA AGA AGC ACA AGA GCG GC CTG CAC CAC ATT TTG GGC AC	۱۵۵۵	(۱۴)
ccrC	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATA	۵۱۸	(۱۴)
ccrA2-B	ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	۴۶۰	(۱۴)
mecA	AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG ATGTATGTGCGATTGTATTGC	۵۸۳	(۱۵)
nucA	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC GCGATTGATGGTGAT ACGGTT	۲۷۰	(۱۶)

یافته‌ها

از ۲۶۹ ایزوله استافیلوکوک اورئوس، ۱۳۵ ایزوله بالینی (۵۰/۱۸٪) *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین تعیین شد. از این میان، ۲۲ ایزوله(۱۶/۲۹٪) از زخم، ۳۲ ایزوله(۲۳/۷۱) از خون، ۴۱ ایزوله(۳۱/۰۶٪) از ادرار، ۹ ایزوله(۹/۶٪) از تراشه، ۶ ایزوله(۴/۴۲٪) از کاتتر، ۱۰ ایزوله(۷/۵٪) از سواپ و ۱۵ایزوله(۱۱/۹٪) از بیماران سرپایی جدا سازی شد. هچنین از میان ۳۵۰ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۵۹ ایزوله (۴۳/۳٪) دارای قطر هاله ۱۴ و مقاوم به سفتازیدیم بودند، ۸۷ ایزوله(۷۵/۱٪) دارای قطر هاله ۲۵ میلیمتر و مقاوم به اریترومایسین ۵ میکروگرم، ۱۱۵ ایزوله(۸۳/۳٪) دارای قطر هاله ۲۹ میلیمتر و مقاوم به پنی سیلین ۱۰ واحدی، ۱۰۵ ایزوله (۷۳/۵۳٪) دارای قطر هاله کمتر از ۱۸ و مقاوم به نورفلوکساسین ۱۵ میکروگرمی، ۶۵ ایزوله(۴۳/۵۳٪) دارای قطر هاله کمتر از۱۸و مقاوم به گاتی فلوکساسین ۱۵ میکروگرمی و ۹۹ ایزوله(۷۰/۶۳٪) دارای قطر هاله ۱۸ و مقاوم به اوفلوکساسین ۵ میکروگرمی بودند. (نمودار۱).

همچنین، کاست ژنی *ccr* در مطالعه حاضر که بر روی ژن‌های *ccrA/B1*، *ccrA/B2*، *ccrA/B3*، *ccrA/B4*، *ccrA2/B*، *ccrC* صورت گرفته بود، به ترتیب در ۲ ایزوله (۱/۳٪) برای ژن *ccrA/B1*، ۱۲ ایزوله(۸/۲٪) برای ژن *ccrA/B2*، ۱۵ ایزوله (۱۰/۳۴٪) برای ژن *ccrA/B3*، ۲ ایزوله (۱/۳٪) برای ژن *ccrA/B4*، ۴ ایزوله (۸/۲٪) برای ژن *ccrA2/B* و ۲۲ ایزوله(۱۵/۸۷٪) برای ژن *ccrC* مثبت بودند (شکل ۱). ارتباط معنی داری بین حضور این ژنها و پراکنش آنتی بیوتیکی مشاهده شد (p=۰/۰۵). در این بین، بیشترین فراوانی ژن های مورد مطالعه از نمونه های ادرار و خون بود. همچنین ارتباط معنی داری بین سویه های دارای مقاومت چند گانه و حضور ژن های کاست *ccr* مشاهده شد. بطوریکه مقادیر *P.value* بدست آمده برای ژن *ccrA/B1* مقدار ۰/۰۳۹، برای ژن *ccrA/B2* مقدار ۰/۰۱۱، برای ژن *ccrA/B3* مقدار ۰/۰۲۶، برای ژن *ccrA/B4* مقدار ۰/۰۳۹، برای ژن *ccrA2/B* مقدار ۰/۰۴۱ و برای ژن *ccrC* مقدار ۰/۰۵ بدست آمد (جدول۲).

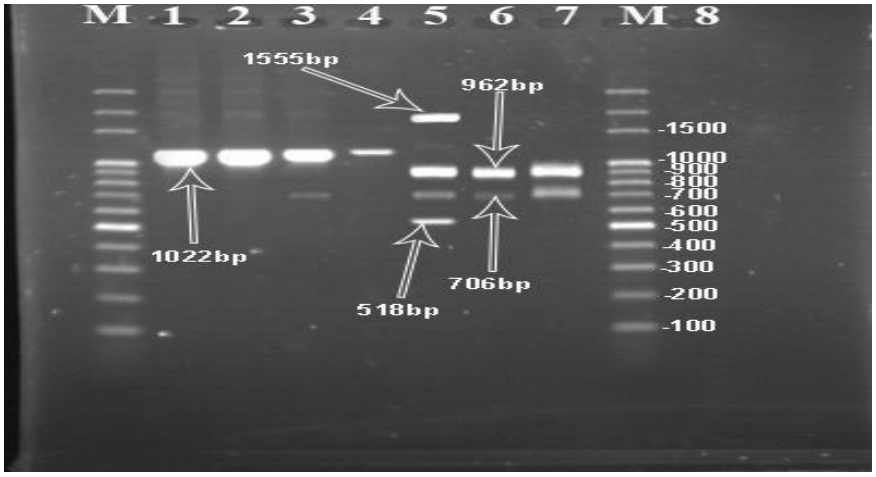


نمودار ۱. فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

جدول۲. فراوانی ژن های تایپ های مختلف لوکوس ccr در ایزوله های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی مختلف

ژن مورد مطالعه	تعداد در نمونه های بالینی مختلف								تعدا ایزوله های دارای این ژن
	خون	ادرار	زخم	بینی	ترشحات	آبسه	کاتاتر	سرپایی	
ccrA/B1	____	۲	____	____	____	____	____	____	۲
ccrA/B2	۲	۸	۲		____	____	____	____	۱۲
ccrA/B3	۷	۵	۳	____	____	____	____	____	۱۵
ccrA/B4	____	۲	____	____	____	____	____	____	۲
ccrA2/B	۱	____	۳	____	____	____	____	____	۴
ccrC	۸	۱۳	۱	____	____	____	____	____	۲۲



شکل ۱. نتیجه الکتروفورز تکثیر موفقیت آمیز محصولات ژن‌های *ccrA/B1*، *ccrA/B2*، *ccrA/B3*، *ccrA/B4* و *ccrA2/B*، با طول آمپلیکون ۱۰۲۲ جفت باز برای ژن *ccrA/B1*، ۹۶۲ جفت باز برای ژن *ccrA/B2*، ۷۰۶ جفت باز برای ژن *ccrA/B3* و ۱۵۵۰ جفت باز برای ژن *ccrA/B4* بر روی ژل اگارز۲/۵ درصد. چاهک ۱ تا ۶ نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن ها. چاهک ۷ کنترل مثبت. چاهک ۸ کنترل منفی. چاهک M مارکر با طول ۱۰۰جفت باز. از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC33591 به عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت و از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده شد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به پنی سیلین و اریترومایسین با فراوانی بیش از ۹۰ درصد بود. این در حالی بود که مقاومت به ونکومایسین چه به صورت حدواسط و چه به صورت کامل در این مطالعه دیده نشد. حضور *استافیلوکوک اورئوس* بعنوان یکی از مهم ترین باکتری های مطرح شده در بروز انواع بیماری های مختلف پیوسته مورد توجه بوده است. این باکتری که در گروه باکتری های بیمارستانی جای گرفته است با طی کردن دوره های زمانی متفاوتی به طیف بسیار گسترده ای آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نسبی و حتی صددرصدی پیدا کرده است، بطوریکه از سال ۱۹۵۰ تا کنون، ظهور سویه ها و زیر سویه های متنوع و خطرناکی را در این باکتری شاهد بوده ایم (۱۹). *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین(*MRSA*) که از اواسط قرن نوزدهم شناسایی و معرفی شد، تاکنون توانسته است، قربانیان بسیار زیادی را بگیرد. این سویه خطرناک که در ابتدای ظهور فقط در بیمارستان ها و بیماران درگیر دیده می شد، با گذشت اندک زمانی به میان جامعه نیز راه پیدا کرد و بصورت ناقل خود را به مکان های متفاوتی رساند (۲۰). در بررسی های صورت گرفته توسط Akia و همکاران در ساوه، مشخص شد که بیش از ۹۰ درصد از ایزوله های بالینی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین و جنتامایسین مقاومت صددرصد دارند(۲۱). همچنین در مطالعاتی که Tafaroji و همکاران در شهر قم داشتند، بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و کلیندامایسین مشاهده شد(۲۲). در شهر همدان، Arabestani و همکاران نشان دادند که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین پنی سیلین، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین می باشد که الگویی با فراوانی بیش از ۹۰درصدی را به خود اختصاص داده اند(۲۳). الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در مطالعه حاضر با مطالعات ذکر شده کاملا همخوانی داشت. البته در برخی مطالعات صورت گرفته در شهرهای مختلف ایران و همچنین سایر کشورهای دیگر، شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی را می توان دید. این امر را می توان به فرهنگ مصرف دارو، الگوی صحیح ارائه نسخه توسط پزشکان، عدم گسترش سویه های جهش زا و همچنین آب و هوای منطقه نسبت داد. کاست ژنی *ccr* در مطالعه حاضر که بر روی ژنهای *ccrA/B1*، *ccrA/B2*، *ccrA/B3*، *ccrA/B4*، *ccrC*،*ccrA2/B* صورت گرفته بود، به ترتیب دارای فراوانی ۱/۳ درصد، ۸/۲ درصد، ۱۰/۳۴ درصد، ۱/۳ درصد، ۲/۷۵ درصد و ۱۵/۸۷ درصد گزارش شد. در مطالعاتی که Urushibara, و همکاران و Zhang همکاران بر روی کاست ژنی *ccr* انجام داده بودند نتایجی مشابه نتایج بدست آمده در این مطالعه را در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

پی داشت(۲۵و۲۴). البته در مطالعه صورت گرفته توسط Ito و همکاران در کشور ژاپن با نتایج بدست آوده در گزارشات مطالعه حاضر تفاوت داشت(۱۳). علاوه بر این در مطالعاتی که Havaei و همکاران در اصفهان داشتند، مشخص شد که ژن *ccrC* دارای بیشترین فراوانی در بین ژن‌های کاست ccr می باشد (۱۵). همچنین مطالعات Hill-Cawthorne و همکاران در عربستان نیز فراوانی ژنی مشابهی را نشان داد (۱۲). از نظر ارتباط بین ژن های مورد مطالعه و سویه های دارای مقاومت چند دارویی، ارتباط معنی داری دیده شد. این در حالی است که Petrelli و همکاران در ایتالیا، Murugesan و همکاران در هند و بین حضور ژن های کاست ccr و حضور سویه های دارای مقاومت چندگانه ارتباط معنی داری گزارش کردند(۲۷و۲۶). احتمال وجود ارتباط بین حضور و فعالیت ژن های کاست *ccr* و مقاومت های چند گانه آنتی بیوتیکی در استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین، در کنار مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی، می تواند سبب مقاومت به سایر کلاس‌های آنتی بیوتیکی نیز شود. با توجه به این امر، لزوم شناسایی بهتر و دقیق تر سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوک اورئوس از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان جهت حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

Identification and Determination of the Relationship between *ccr* Alleles and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

M. Vafaeefar (Msc)[1], M. Yousef Alikhani (PhD)[1], H. Tahmasebi (Msc)[2], M.R. Arabestani (PhD)*[3]

1.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R.Iran
3.Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(12); Dec 2017; PP: 28-35
Received: May 14th 2017, Revised: Oct 14th 2017, Accepted: Oct 28th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Resistance to methicillin and the presence of the *ccr* gene in *Staphylococcus aureus* have provided the basis for the emergence of methicillin resistant strains. The aim of this study was to identify the ccr cassette alleles in methicillin-resistant *S.aureus* strains and to determine the relationship between the presence of these casts with a multivariate process.

METHODS: In this study, 135 clinical isolates of methicillin-resistant *S.aureus* was isolated by genotypic methods. *ccr* gene cassette was evaluated qualitatively by multiplex PCR method. Data was analyzed using SPSS version 16 and also, the chi - square test was used.

FINDINGS: Out of 135 strains of *S.aureus* resistant to methicillin, penicillin and erythromycin antibiotic resistance were the most frequent, more than 90%, respectively. Also, *ccr* gene cassette in the study on genes *ccrA/B1*, *ccrA/B2*, *ccrA/B3*, *ccrA/B4*, *ccrA2/B*, *ccrC* had taken place, respectively, in 2 isolates (1.3%) for gene *ccrA/B1*, 12 isolates (8.2%) *ccrA/B2*, 15 isolates (10.34 %) *ccrA/B3*, 2 isolates (1.3%) *ccrA/B4*, 4 isolates (8.2 percent) *ccrA2/B* and 22 isolates (15.87 %) were positive for the gene *ccrC*. A significant correlation between the presence of these genes and antibiotic distribution was observed (p=0.05).

CONCLUSION: The *ccr* gene cassette can provide a background of resistance to various antibiotics in methicillin-resistant *S.aureus* strains.

KEY WORDS: *Antibiotic Resistance, Methicillin Resistance Staphylococcus Aureus, Ccr Cassettes*.

Please cite this article as follows:

Vafaeefar M, Yousef Alikhani M, Tahmasebi H, Arabestani MR. Identification and Determination of the Relationship between ccr Alleles and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(12):28-35.

* **Corresponding author: M.R. Arabestani (PhD)**
Address: Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran
Tel: +98 81 3838077
E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

References

1.Zong Z. Characterization of a complex context containing mecA but lacking genes encoding cassette chromosome recombinases in Staphylococcus haemolyticus. BMC Microbiol. 2013;13(1):64.

2.Agnoletti F, Mazzolini E, Bacchin C, Bano L, Berto G, Rigoli R, et al. First reporting of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. Vet Microbiol. 2014;170(1-2):172-7.

3.Taylor AR. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections. Prim Care. 2013;40(3):637-54.

4.Zeyni B, Arabestani M, YuosefiMashof R, Tahmasebi H. Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in clinical isolates. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(2):26-33.[In Persian].

5.Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani SH, Malekianzadeh E. Staphylococcus aureus resistance to vancomycin: a six years survey,(2006-2012). Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv. 2013;35(5):40-5.[In Persian].

6.Santosaningsih D, Santoso S, Budayanti NS, Suata K, Lestari ES, Wahjono H, et al. Characterisation of clinical Staphylococcus aureus isolates harbouring mecA or Panton-Valentine leukocidin genes from four tertiary care hospitals in Indonesia. Trop Med Int Health. 2016;21(5):610-8.

7.Sahebnasagh R, Saderi H, Owlia P. The Prevalence of Resistance to Methicillin in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Patients by PCR Method for Detec-tion of mecA and nuc Genes. Iran J Public Health. 2014;43(1):84-92.

8.Yancheng Y, Hang C, Renjie Z, Xiancai R. Application of the SCCmec element in the molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Yi chuan = Hereditas. 2015;37(5):442-51.

9.Khokhlova O, Tomita Y, Hung WC, Takano T, Iwao Y, Higuchi W, et al. Elderly infection in the community due to ST5/SCCmecII methicillin-resistant Staphylococcus aureus (the New York/Japan clone) in Japan: Panton-Valentine leukocidin-negative necrotizing pneumonia. J Microbiol Immunol Infect. 2015;48(3):335-9.

10.Monecke S, Jatzwauk L, Muller E, Nitschke H, Pfohl K, Slickers P, Ehricht R. Diversity of SCCmec elements in staphylococcus aureus as observed in south-eastern germany. PLoS One. 2016;11(9).

11.Halebeedu Prakash P, Rajan V, Gopal S. Predominance of SCCmec types IV and V among biofilm producing device-associated Staphylococcus aureus strains isolated from tertiary care hospitals in Mysuru, India. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017;35(4):229-35.

12.Hill-Cawthorne GA, Hudson LO, El Ghany MFA, Piepenburg O, Nair M, Dodgson A, et al. Recombinations in staphylococcal cassette chromosome mec elements compromise the molecular detection of methicillin resistance in staphylococcus aureus. PloS one. 2014;9(6):101419.

13.Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA. Methods Mol Biol. 2014;1085:131-48.

14.Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(10):5026-33.

15.Havaei SA, Azimian A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic Characterization of Methicillin Resistant and Sensitive, Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus Strains Isolated from Different Iranian Hospitals. ISRN Microbiology. 2012;2012:6.

16.Karmakar A, Dua P, Ghosh C. Biochemical and Molecular Analysis of Staphylococcus aureus Clinical Isolates from Hospitalized Patients. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2016;2016:7

17.CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]

18.Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The Presence of aac (6 ') Ie / aph (2 "), aph (3') - IIIa1, ant (4 ') - Ia1 Genes and Determining Methicillin Resistance in Staphylococcus Epidermidis and Staphylococcus Saprophyticus Strains Isolated from Clinical Specimens. Arak Med Univ J. 2017;19(11):11-25. [In Persian].

19.Shashindran N, Nagasundaram N, Thappa DM, Sistla S. Can panton valentine leukocidin gene and clindamycin susceptibility serve as predictors of community origin of mrsa from skin and soft tissue infections?. J Clin Diagn Res. 2016;10(1):DC01-4.

20.Gomez P, Lozano C, Camacho MC, Lima-Barbero JF, Hernandez JM, Zarazaga M, et al. Detection of MRSA ST3061-t843-mecC and ST398-t011-mecA in white stork nestlings exposed to human residues. J Antimicrob Chemother. 2016;71(1):53-7.

21.Akia A AK. The prevalence of van gene alleles in clinical isolates of Staphylococcus aureus. Sci J Kurdistan Univ Med Sci. 2017;21(6):64-71.[In Persian].

22.Tafaroji J, Aghaali M, Heydari H. An investigation of the frequency of staphylococcus aureus nasal carriers and its antibiotic susceptibility pattern in the staff of different wards of qom hazrat masumeh hospital, 2015, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2017;10(11):79-84. [In Persian].

23.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.

24.Urushibara N, Paul SK, Hossain MA, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Analysis of Staphylococcal cassette chromosome mec in Staphylococcus haemolyticus and Staphylococcus sciuri: identification of a novel ccr gene complex with a newly identified ccrA allotype (ccrA7). Microb Drug Resist. 2011;17(2):291-7.

25.Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM. Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(2):531-40.

26.Petrelli D, Repetto A, D'Ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, et al. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming Staphylococcus aureus from catheter infections isolated in a large Italian hospital. J Medical Microbiol. 2008;57(3):364-72.

27.Murugesan S, Perumal N, Mahalingam SP, Dilliappan SK, Krishnan P. Analysis of antibiotic resistance genes and its associated SCCmec types among nasal carriage of methicillin resistant coagulase negative staphylococci from community settings, chennai, southern India. J Clin Diagnos Res. 2015;9(8):Dc01-5.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.5.8]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.28]