مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۳، اسفند ۱۳۹۵، صفحه ۴۶-۳۸

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

محمد بکائیان (PhD)[۱]، حامد طهماسبی (Msc)[۱*]

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 aac(6')Ie/aph(2'')، aph(3')-IIIa1، ant(4')-Ia1 به همراه ژن mecA است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۱۱۳ ایزوله استافیلوکوک اورئوس از۵۷۹ نمونه مختلف بالینی جداسازی شد. برای تعیین سویه های مقاوم به متی سلین از روش تعیین حداقل غلظت مهاری با نوارهای E-test اوگزاسیلین استفاده شد. شناسایی ژنهای aac(6')Ie/aph(2'')، aph(3')-IIIa1، ant(4')-Ia1 و mecA با استفاده از روش PCR، انجام شد. همچنین ارتباط حضور ژنهای آمینوگلیکوزیدی و ژن mecA نیز بررسی گردید.

یافته‌ها: از ۱۱۳ ایزوله بالینی استافیلوکوک اورئوس که با تست های فنوتیپی تایید شده بودند،۵۳ ایزوله (۴۶/۹۱ ٪) دارای ژن mecA، ۴۳ ایزوله(۳۸/۰۵٪) دارای ژن aac(6')Ie/aph(2'')، ۱۹ایزوله(۱۶/۸۱٪) دارای ژن aph(3')-IIIa1 و۲۲ ایزوله(۱۹/۴۷٪) دارای ژن ant(4')-Ia1 بودند. همچنین بین حضور ژن مقاومت به متی سیلین و ژنهای عامل مقاومت به آمینوگلیکوزید ارتباط معنی‌داری 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($p\leq ۰/۰۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که استفاده مکرر از آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی به همراه آنتی بیوتیک های بتالاکتامی 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.

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

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزای بیمارستانی می‌باشد که دارای قابلیت های بالقوه ای در ایجاد طیف گسترده ای از عفونتها می باشد (۱). بیماری های وابسته به این باکتری می تواند از یک عفونت پوستی ساده تا پنومونی نکروزه کننده کشنده،تا بیماری های پوستی مانند سندرم فلسی شدن پوست و سندرم شوک سمی استئومیلیت، عفونتهای ادراری و حتی مسمومیت های غذایی انسان رادرگیر کند(۵-۲). 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 سال۱۹۹۰ تا سال ۲۰۰۰ بیش از ۱۲۰هزار بیمارستان در سطح دنیا را آلوده به این باکتری گزارش کرد(۸). در سال ۱۹۶۱، نخستین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) شناسایی گردیدکه 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(۱۰و۹). استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین کسب شده از بیمارستان(HA-MRSA) در مدتی کوتاه به جامعه نیز راه پیدا کردند و سبب ظهور سویه‌های CA-MRSA شدند(۱۱). مقاومت نسبت به متی‌سیلین 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

▣ 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

وmecC) و کمپلکس cassette chromosome (ccr)recombinase است(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(۱۵و۱۴). گاهی برای افزایش اثر بخشی این آنتی بیوتیک ها، از آنتی بیوتیک های بتالاکتامی و گلیکوپپتیدی درکنارآنتی 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(" aph (2 ") Ie / aac (6 ') - IIIa1،aph (3') و ant (4 ") 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″)، APH(3′)-III و ANT(4′) که به ترتیب توسط ژنهای (”aac(6’)-Ie/aph(2، aph(3′)-IIIa و ant(4′)-Ia رمز می شوند جزء شایعترین آنزیم های تغییردهنده در گونه های مختلف استافیلوکوکی می باشند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند (۱۸و۱۴) 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 (" aac (6 ') Ie / aph (2، مقاومت نسبت به نئومایسین، توبرامایسین، آمیکاسین ناشی از حضور ژن رمزکننده ant (4 ') - Ia1 و آنزیم aph (3')- IIIa1 باعث ایجاد مقاومت نسبت به کانامایسین و توبرامایسین می شود(۲۰و۱۹و۱۶). برای شناسایی فنوتیپی سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی باید از طیف مناسبی از آنتی بیوتیکهای آمینگلیوزیدی 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(۲۳و۲۲). یکی از بهترین و حساس ترین راه ها برای تشخص سویه های مقاوم، ردیابی ژن‌های مسئول توزیع آنزیم های عامل مقاومت توسط روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) می‌باشد. 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 سویه‌های مقاوم و حضور ژنهای (aac(6')Ie/aph(2")، aph(3')-IIIa1، ant(4')-Ia1 به همراه ژن mecA نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری ها: در این مطالعه مقطعی، با کد کمیته اخلاق ir.zaums.rec.1394.250 با استفاده از روش نمونه‌گیری آسان و در دسترس، طی یک دوره ۱۱ ماهه ۵۹۷ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، مایع مغزی-نخاعی، سواپ بینی، زخم، ترشحات، تراشه، 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 پرونده بیمار) در بیمارستان بستری و مشکوک به عفونت های باکتریای بودند وارد مطالعه شدند و در صورت عدم عفونی بودن بیماری با زمینه باکتریایی از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های بدست آمده بعد از کشت اولیه، توسط آزمایش‌های 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 مهاری(MIC) با استفاده از نوارهای E-test اوگزاسیلین(Himedia هند)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 سویه‌های کنترلی استفاده شد (۲۴).

تعیین الگوی مقاومتی به آنتی بیوتیک های آمینوگلکوزیدی در استافیلوکوک اورئوس: برای تعیین الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی از دیسکهای آنتی بیوتیکی جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، آمیکاسین(۳۰میکروگرم)، کانامایسین(۳۰میکروگرم)، توبرامایسین(۱۰میکروگرم) و نیتیل مایسین(۱۰میکروگرم) 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 بمدت۲۴ساعت 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 ازکشت ۲۴ساعته به ۵میلی لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (Merck آلمان) که قبلا 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: ۲میکرولیتر از DNA الگو، ۱میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت۲۵پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر از MasterMixe (شرکت Ampliqonآلمان) (شامل Tris-Hcl PH8.5, $(NH_4)SO_4$, 3mMMgcl$_2$, 0/2%Tween20، 0/4MmdNTP، 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 ۴۵۱ 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-

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

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 ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها بمدت ۴۵ ثانیه برای ژن aac(6')Ie/aph(2") در دمای ۵۶°C و برای ژنهای aph(3')-IIIa1 و ant(4')-Ia1 ۴۰ ثانیه در دمای ۵۲°C در نظر گرفته شد. تکثیر اولیه هم به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲°C لحاظ گردید. برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱۰دقیقه از دمای ۷۲°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.

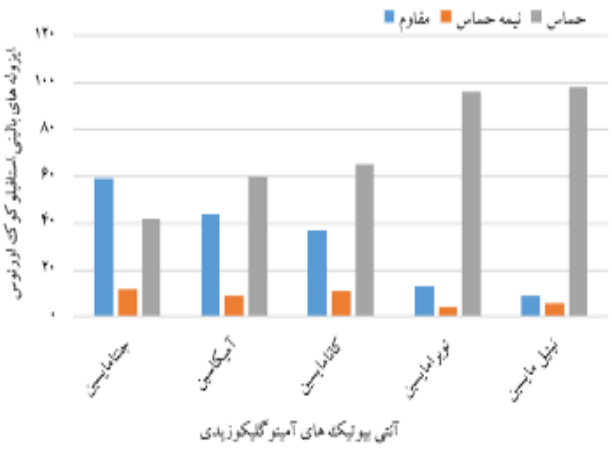
الکتروفورز روی ژل اگارز۱/۵درصد: ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۳ درصد در بافرX۰/۵ الکتروفورز گردید. از مارکر bp ۱۰۰ فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. آزمون PCR بعنوان گلداستاندارد برای مقایسه با سایر نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

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 $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظرگرفته شد.

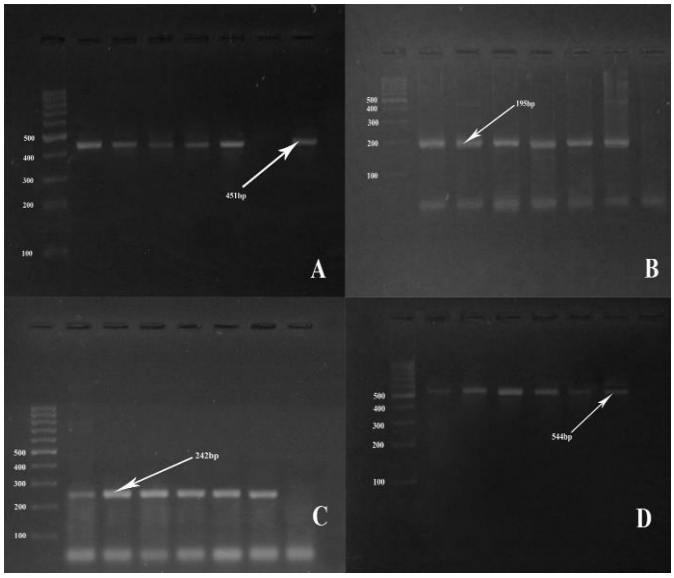
یافته ها

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 سواپ بینی، ۱۹ایزوله(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 مونث 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 جنتامایسین 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 جنتامایسین و آمیکاسین بود و کمترین مقاومت هم آنتی بیوتیک توبرامایسین از خود نشان داد(نمودار ۱). براساس آزمون PCR از ایزوله‌های 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 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(جدول۱). 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($p\leq۰/۰۱۱$)، ($p\leq۰/۰۴۱$)، ($p\leq۰/۰۲۹$).



نمودار۱. توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی



شکل۱. A: انجام PCR بر روی ژن aac(6') Ie/aph(2") با طول ۴۵۱جفت باز. B: انجام PCR بر روی ژنant (4')-Ia1 با طول ۱۹۵جفت باز C: انجام PCR بر روی ژن aph(3')-IIIa1 با طول ۲۴۲جفت باز. D: انجام PCR بر روی ژن mecA با طول ۵۴۴جفت باز. چاهک۶: کنترل مثبت *استافیلوکوک اورئوس* ATCC43300. چاهک ۵ کنترل منفی سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوسATCC25923 M.:مارکر۱۰۰جفت بازی. چاهک های ۱تا۴: نمونه های مثبت از نظر حضور ژن

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

جدول۱. فراوانی حضور ژنهای aac(6')Ie/aph(2")، aph(3')-IIIa1، ant(4')-Ia1 و mecA

در ایزوله های بالینی اورئوس بر اساس نمونه های بالینی جدا شده

استافیلوکوکوس اورئوس نوع نمونه	mecA(n=۵۳) تعداد(درصد)	aac (6') Ie/aph (2")(n=۴۳) تعداد(درصد)	aph (3')-IIIa1(n=۱۹) تعداد(درصد)	ant (4')-Ia1(n=۲۲) 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
سواپ 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

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 سواپ 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 سویه‌های 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 استافیلوکوک‌های اورئوس دارای مقاومت به متی‌سیلین می باشد (۲۵). از طرفی نتایج حاصل از تعیین الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی مربوط به جنتامایسین بود که ۵۹ایزوله(۵۲/۲۱٪) را به خود اختصاص داد از این نظر با نتایج بدست آمده توسط Gladو همکاران در کویت(۲۶)، 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(۳۰و۲۹). این چنین تفاوتهایی که در برخی موارد در گزارشات گوناگون از مناطق مختلف دیده می شود را می توان به تغییر سویه 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 ۳۰درصد گزارش کرده بودند که با این مطالعه کاملا تفاوت دارد(۳۱).

توبرا مایسین و نیتیل مایسین از دیگر آنتی بیوتیکهایی 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 هیچگونه همخوانی نداشت. در این مطالعه میزان مقاومت به توبرامایسین و نیتیل مایسین بیش از ۳۰درصد گزارش شده است که از مقدار بدست آمده در مطالعه ما بیشتر می باشد (۲۹). Hammerberg و همکاران در انگلیس، نشان دادند که ارتباط معنی‌داری 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 کاملا 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(۳۴-۳۱).

به علاوه مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک 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 ارئوس می باشد(۳۶و۳۵). 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 aph (3') -IIIa1 و ۲۲ ایزوله دارای ژن ant (4') - Ia1 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 aph (3') - IIIa1 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 aph (3')- IIIa1 با شیوع ۱۱/۵۰ درصدی شده است که با مطالعات ذکر شده همخوانی ندارد(۳۰و۲۱).

از نظر فراوانی ژن‌ها 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 (۳۸و۳۷). در مطالعـــه ای که توسط Temiz و همکـــاران

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

ترکیـــــه انجام شد، فراوانـــی ژن هـــای(" 2) aac (6 ') Ie/ aph در حدود ۷ درصد و فراوانی ژن aph (3') - IIIa1 هم حدود ۱۰ درصد گزارش شدند که از مقادیر بدست آمده در مطالعه حاضر کمتر می باشند (۳۹). Choi و همکاران نیـز در مطالعه ای در کره جنوبی انجام دادند، فراوانی ژن‌هـای aac (6 ') Ie / aph (2 "), aph (3') - IIIa1, ant (4 ') - Ia1 را به ترتیب ۸۳، ۲۱ و ۴۲ درصـد 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.

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 ابی‌طالب زاهدان به ویژه خانم ریگی و مظاهری به دلیل همکاری ایشان در جمع آوری نمونه ها، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

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 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 ') - Ia1and 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 aurous, 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

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. koomesh. 2014;16(1):82-9.[In Persian].

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.19.3.5.6]
[DOI: 10.22088/jbums.19.3.38]