

Prevalence of Antibiotic Resistance in Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Determining Aminoglycoside Resistance Gene by PCR in Sari and Tehran Hospitals

Seyyed Mohsen Mahdiyoun¹,
Mohammad Ahanjan²,
Mehdi Goudarzi³,
Razieh Rezaee⁴

¹MSc Student in Microbiology, Faculty Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

²Mazandaran Pediatric Infectious Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ MSc in Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received February 24, 2015 ; Accepted August 23, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is one of the major causes of community and hospital-acquired infections. Aminoglycosides are potent bactericidal agents that are often used in combination with beta-lactam or glycopeptide in treatment of staphylococcal infections. The aim of this study was to investigate the prevalence of the aminoglycoside modifying enzyme aac(6')-Ie/aph(2'') genes and mecA.

Materials and methods: In current study, 174 clinical isolates of MRSA from different clinical specimens were tested for antibiotic susceptibility using the Kirby Bauer method. MRSA isolates were detected by disc diffusion method using 1 ug oxacillin and 30 ug cefoxitin discs. Then, MRSA strains were further analyzed for detection of mecA and aminoglycoside resistant aac(6')-Ie/aph(2'') genes by PCR.

Results: All strains were resistant to oxacillin and cefoxitin. The highest and lowest resistances were found against erythromycin (85.1%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (24.7%), respectively. In PCR, mecA gene was detected in 100% of the strains and 77% of the strains were found to harbor aac(6')/aph(2//)-Ia gene.

Conclusion: According to this study, the prevalence of aminoglycosides resistant genes is increasing in MRSA isolates.

Keywords: mecA gene, aac(6')-Ie/aph(2'') gene, aminoglycoside modifying enzyme, *Staphylococcus*

شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و تعیین ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید به روش PCR در بیمارستان های ساری و تهران

سید محسن مهدیون^۱

محمد آهانجان^۲

مهدی گودرزی^۳

راضیه رضایی^۴

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم ترین عوامل عفونت جامعه و بیمارستان است. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری کش قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتامها یا گلیکوپپتیدها در درمان عفونت های استافیلوکوکی مصرف می شوند. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن $aac(6')-Ie/aph(2'')$ کدکننده یکی از مهم ترین آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن $mecA$ است.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۷۴، MRSA جدا شده از نمونه های مختلف بالینی، برای تعیین مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها با روش کربی بوئر انجام شد. وجود MRSA با گذاشتن دیسک های آنتی بیوتیکی اگراسیلین و سفوکسیتین مورد بررسی قرار گرفت. سپس DNA جدا شده از MRSA برای یافتن ژن های $mecA$ و ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها $aac(6')-Ie/aph(2'')$ به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد تمامی جدایه ها به اگراسیلین و سفوکسیتین مقاوم بودند و پس از آن بیش ترین و کم ترین مقاومت به ترتیب به اریترومايسين با ۸۵/۱ درصد و کوتریموکسازول با ۲۴/۷ درصد مشاهده شد. در PCR ۱۰۰ درصد سویه ها از نظر ژن $mecA$ و ۷۷ درصد جدایه ها نیز از نظر حضور ژن $aac(6')-Ie/aph(2'')$ مثبت بودند.

استنتاج: بررسی ها نشان داد که در ایزوله MRSA درصد شیوع ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها روبه افزایش است.

واژه های کلیدی: ژن $mecA$ ، آنزیم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، استافیلوکوک

مقدمه

در بیماران شود. از جمله آن ها می توان به: سپتی سمی، پنومونی، سپسیس زخم، اندوکاردیت، عفونت های وابسته به کاتتر و عفونت مجرای ادراری اشاره نمود (۲). مقاومت

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم ترین عوامل عفونت های منشاء گرفته از جامعه و بیمارستان است (۱). این باکتری می تواند منجر به بروز عفونت های مختلفی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۴۱۰ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

E-mail: ahanjan2007@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد آهانجان - کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی اطفال مازندران، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱۲/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۱

به متی‌سیلین در سوش‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus: MRSA*) برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ یعنی تنها چند سال پس از شروع تجویز متی‌سیلین در انگلستان مشاهده شد، و هم اکنون به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی رایج مطرح می‌باشد (۳). از آن زمان فراوانی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین دائماً افزایش یافت، به طوری که عفونت‌های بیمارستانی گسترده‌ای در نقاط مختلف دنیا در دهه ۱۹۷۰ گزارش شد (۴).

MRSA سویه‌ای از استافیلوکوک اورئوس می‌باشد که به یک گروه بزرگ آنتی‌بیوتیک‌ها به نام بتالاکتام‌ها، که شامل پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند، مقاوم است. مقاومت به متی‌سیلین نشان دهنده مقاومت به تمامی پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز و سفالوسپورین‌ها می‌باشد (۳). تقریباً به تمام ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یک پروتئین متصل به پنی‌سیلین (Penicillin binding protein: PBP) اضافه شده است. که PBP^{2a} نامیده می‌شود. PBP^{2a} نسبت به PBP² میل ترکیبی بسیار کم‌تری به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی دارد، که هدف اصلی فیزیولوژیکی متی‌سیلین می‌باشد. PBP^{2a} توسط ژن *mecA* کد گذاری می‌شود (۵). با گذشت زمان، همراه با گسترش بیشتر ایزوله‌های MRSA، این باکتری‌ها به مرور نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مثل تتراسایکلین‌ها، آمینوگلیکوزیدها، لینکوزامیدها و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و درمان عفونت‌ها را مشکل‌تر از گذشته کرده‌اند (۴، ۶). آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی یکی از عوامل مهم آنتی‌باکتریال می‌باشند که برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی به خصوص عفونت‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌هایی مانند اندوکاردیت باکتریایی که توسط اتروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود، کاربرد دارند (۸).

آمینوگلیکوزیدها، این مولکول‌های کاتیونی، با اتصال به زیر واحد ۳۰S ریبوزومی سبب قطع ترجمه باکتری شده و اثرات آنتی‌باکتریال خود را اعمال می‌کنند (۹). سه مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها شامل: تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو می‌باشد. در این میان غیرفعال‌سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycoside-Modifying Enzymes: AME) اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت در گونه‌های استافیلوکوکی است. این آنزیم‌ها براساس فعالیت تغییر دهندگیشان به سه رده مختلف طبقه‌بندی می‌شوند و شامل: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها، (Aminoglycoside-acetyltransferase: AACs) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferase: APHs) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferase: ANTs) هستند. سه آنزیم AAC(6')/APH(2'')، APH(3')-III و ANT(4') که به ترتیب توسط ژن‌های *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa*، *aac(6')-Ie/aph(2'')* رمز می‌شوند، جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند (۱۰).

با توجه به اهمیت بیماری‌زایی، شیوع بالای مقاومت به متی‌سیلین، حضور مداوم و گسترش سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و بالا بودن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در این سویه‌ها و با تاکید بر نقش آمینوگلیکوزیدها در درمان ترکیبی عفونت‌های استافیلوکوکی مطالعه دوره‌ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضرورت دارد. هدف این تحقیق بررسی شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و تعیین ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید (*aac(6')-Ie/aph(2'')*) جدا

شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های زارع ساری، لقمان حکیم و پارس تهران به روش PCR است.

مواد و روش‌ها

۱-۲- جمع‌آوری و تشخیص باکتری‌ها

در این مطالعه مقطعی ۱۷۴ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از نمونه‌های بالینی مختلف نظیر زخم، خون، خلط، ترشه، برونش، پلور، کاتر و ادرار از سه بیمارستان زارع ساری، لقمان و پارس در تهران طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ به روش تصادفی جمع‌آوری شد. تمامی سویه‌ها ابتدا روی محیط مانیتول نمک آگار تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کشت داده شدند و سپس برای تعیین هویت سویه‌ها از رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کوآگولاز و DNase برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد (۱۱). در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط تریپتیک سوی برات تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حاوی ۱۵ درصد گلیسرول است و ککشت ذخیره تهیه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تعداد کل ایزوله‌ها و تفکیک محل نمونه‌گیری در بیمارستان‌های مورد مطالعه

محل نمونه بیمارستان	خون	خلط	ترشه	برونش	پلور	ادرار	زخم	کتر
لقمان تهران	۳	۶	۳۱	۱۱	۶	۱۰	۱۷	۴
پارس تهران	۲	۳	۱۴	۹	۴	۶	۱۰	۲
زارع ساری	-	۲	۱۱	۷	۳	۵	۵	۳
کل	۵	۱۱	۵۶	۲۷	۱۳	۲۱	۳۲	۹

۲-۲- تعیین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

برای تعیین استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین ابتدا از روش انتشار دیسک روی آگار استفاده شد. جهت تشخیص فنوتیپی ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از دیسک ۱ میلی‌گرم اگزاسیلین (OX) و ۳۰ میلی‌گرم سفوکسیتین (FOX) بر

روی محیط مولر هینتون آگار دارای ۴ درصد NaCl طبق توصیه (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards استفاده گردید. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین کم‌تر از ۲۱ میلی‌متر و نسبت به دیسک سفوکسیتین کم‌تر از ۱۳ میلی‌متر بود، نمونه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد (۱۲، ۵).

۳-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها

برای تعیین الگوی مقاومتی سویه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین (۵ μg)، ونکومايسين (۳۰ μg)، تری متوپریم+سولفامتوکسازول (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۵ μg)، اریترومايسين (۱۵ μg)، سیپروفلوکسازین (۵ μg)، کلیندامایسین (۲ μg)، سفازولین (۳۰ μg)، دوکسی‌سیکلین (۳۰ μg) و سفوکسیتین (۳۰ μg). مطابق روش انتشار از دیسک کری-باثر با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast, UK) و با رعایت استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) بررسی شد (۱۲، ۵).

برای کنترل کیفی دیسک‌ها و پودرهای آنتی‌بیوتیک از سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 استفاده شد. هم‌چنین از سویه استافیلوکوک اورئوس MRSA 400 (تهیه شده از بانک میکروبی بیمارستان بوعلی تهران) مقاوم به اگزاسیلین برای کنترل مقاومت به اگزاسیلین استفاده گردید (۱۳).

۴-۲- استخراج ژنوم

برای استخراج DNA از سویه‌های استافیلوکوک اورئوس از کیت‌های استخراج DNA (QiaAmp DNA Mini Kit Cat.No: 51304) استفاده شد. مقداری از کلنی ایزوله‌ها به محیط کشت LB برات (Merck, Germany, Cat Number: 11285) تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۲۴ درجه سانتی‌گراد

در سال ۱۹۹۴ توسط Vanhoof و همکاران معرفی شد و توالی آن در جدول شماره ۲ آورده شده، استفاده گردیده است. واکنش PCR برای ۱۷۴ ایزوله MRSA صورت گرفت. نمونه استاندارد ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت برای ژن های مقاومت آمینوگلیکوزیدی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد (۱۵).

جدول شماره ۲: توالی آغازگر های مورد استفاده به همراه اندازه

محصولات قطعات PCR

منبع	سایز	Perimer Sequencing	Gene
(۵)	۳۱۰	5'GTAGAATGACTGAACGTCGATAA3' 5'CCAATTCACATGTTCGGTCTAA3'	mecA
(۱۸)	۲۲۲	5'CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC3' 5'CACACTATCATAACCACTACCG3'	aac(6)- Ie/aph(2')

مخلوط نهایی واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرومول از هر جفت آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon، ۳ میکرولیتر DNA الگو که با ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس ویالها در دستگاه ترموسایکلر (Pio Intellectica Canada) قرار گرفت. برنامه دستگاه ترموسایکلر در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: مراحل واکنش PCR برای شناسایی ژن های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و mecA

فاکتور	دما (°C)	زمان
ژن مرحله		
واکشن اولیه	94°C	5 min
واکشن	94°C	1min
اتصال	57°C	1 min
تکثیر	72°C	30 s
تکثیر نهایی	72°C	8min
تعداد سیکل	۳۵	

یافته ها

در این بررسی که از بهمن ۱۳۹۲ تا مهر ماه سال ۱۳۹۳ انجام شد ۱۷۴ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه های مختلف بالینی نظیر: خون (۳/۱ درصد)، خلط (۶/۲ درصد)، آگزداي تراشه (۳۱/۹ درصد)، برونش (۱۵/۵ درصد)، پلور (۷/۷ درصد)، کاتتر (۸ درصد) ادرار (۱۲ درصد) و زخم (۱۸/۲ درصد)

و پس از آن سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت. طبق پروتکل کیت بر روی رسوب حاصله ۲۰۰µL از بافر لیزکننده (برای تخلیص بهتر و بیش تر DNA از آنزیم لیزواستافین (Sigma, St Louis, USA) نیز استفاده شد) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول های ذکر شده در پروتکل الصافی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس با افزودن اتانول مطلق سرد و سانتریفیوژ آن و اضافه نمودن اتانول ۷۰ درصد و بیرون ریختن مواد رویی DNA استخراج شده رسوب کرد. سپس بافر حل کننده به رسوب DNA اضافه و در دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد. (تمام مراحل در پروتکل الصافی به طور کامل توضیح داده شده).

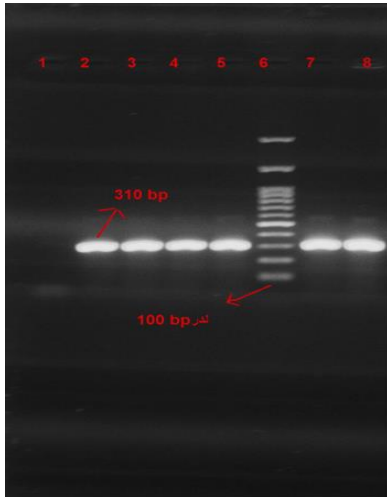
۲-۵- تایید ژنتیکی ایزوله ها

برای تایید استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین بررسی تمام ایزوله ها از نظر وجود ژن mecA و با استفاده از PCR که در سال ۲۰۰۹ توسط S.Suhaili و همکاران مورد استفاده قرار گرفته بود (۵) به روش PCR صورت گرفت (جدول شماره ۲). برای اطمینان از درست بودن کار در آزمایش های PCR و الکتروفورز از نمونه استاندارد ATCC25923 به عنوان کنترل مثبت برای سویه استافیلوکوک اورئوس و هم چنین از نمونه استاندارد ATCC700698 به عنوان کنترل مثبت برای سویه های MRSA استفاده شد (۱۴).

۲-۶- واکنش مولکولی PCR

برای تکثیر ژن aac(6')-Ie/aph(2'') که از شایع ترین آنزیم های تغییر دهنده در گونه های مختلف استافیلوکوک ها هستند و سبب غیر فعال سازی آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی می شوند و از اهمیت بالینی و درمانی برخوردارند از یک جفت پرایمر اختصاصی (ستتر پرایمر توسط ژن فن آوران ایران) که

جدا شده از بیمارستان های زارع شهر ساری (۲۰/۷ درصد)، لقمان حکیم (۵۰/۵ درصد) و پارس (۲۸/۸ درصد) تهران مورد بررسی قرار گرفتند (جدول شماره ۴) نتایج آنتی بیوگرام به روش انتشار از دیسک کربی - بائر که ۱۰۰ درصد به سفوکسیتین و آگزاسیلین مقاوم بودند، نشان داد، بالاترین میزان مقاومت در برابر اریترومايسين (۸۵/۱ درصد) و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در مقابل کلیندامایسین (۷۷/۶ درصد)، سفازولین (۷۷ درصد)، سیپروفلوکساسین (۷۵/۹ درصد)، ریفامپین (۵۷/۵ درصد)، داکسی سیکلین (۵۵/۲ درصد) و کمترین میزان مقاومت در مقابل کوتریموکسازول (۲۴/۷ درصد) بود. و نیز تمام سویه ها به ونکومايسين حساس بودند. هم چنین میزان مقاومت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینو گلیکوزیدی (۷۴/۱ درصد) مشاهده شد.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن *mecA* (قطعه ۳۱۰ جفت بازی) به وسیله PCR ردیف ۱: کنترل منفی
ردیف ۲: کنترل مثبت ATCC700698
ردیف ۳-۸: نمونه بالینی
ردیف ۶: لدر ۱۰۰ bp

جدول شماره ۴: فراوانی نمونه های جدا شده و تفکیک محل نمونه گیری در ۳ بیمارستان مورد مطالعه

محل نمونه بیمارستان و فراوانی نمونه ها	خون (۳/۱)	خلط (۶/۲)	تراشه (۳۱/۹)	برونش (۱۵/۵)	پلور (۷/۷)	ادراک (۱۲)	زخم (۱۸/۲)	کتر (۸)
لقمان تهران (۵۰/۵ درصد)	۳	۶	۳۱	۱۱	۶	۱۰	۱۷	۴
پارس تهران (۲۸/۸ درصد)	۲	۳	۱۴	۹	۴	۶	۱۰	۲
زارع ساری (۲۰/۷ درصد)	-	۲	۱۱	۷	۳	۵	۵	۳
کل	۵	۱۱	۵۶	۲۷	۱۳	۲۱	۳۲	۹

جدول شماره ۵: میزان مقاومت چند دارویی

تعداد آنتی بیوتیک	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۷ آنتی بیوتیک	۶۶ (۳۷/۹)	۴۷ (۲۷)	۱۹ (۱۰/۹)	۸ (۴/۵)	۹ (۵/۱)
۳ آنتی بیوتیک					
۴ آنتی بیوتیک					
۵ آنتی بیوتیک					
۶ آنتی بیوتیک					
۳ آنتی بیوتیک					

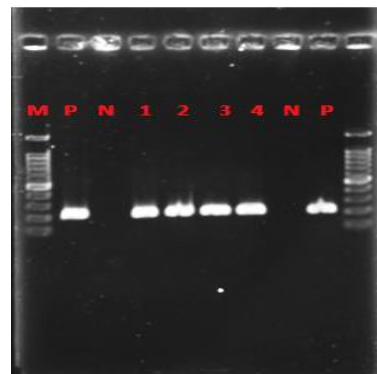
جدول شماره ۶: میزان مقاومت چند گانه دارویی در ایزوله های جدا شده از بیمارستان های مختلف

مقاومت چند گانه دارویی	درصد کل مقاومت چند گانه	لقمان	پارس	زارع
۳ آنتی بیوتیک	۹ (۵/۱)	۵ (۵۵/۵)	۲ (۲۲/۲)	۲ (۲۲/۲)
۴ آنتی بیوتیک	۸ (۴/۵)	۴ (۵۰)	۱ (۱۲/۵)	۳ (۳۷/۵)
۵ آنتی بیوتیک	۱۹ (۱۰/۹)	۷ (۳۶/۸)	۷ (۳۶/۸)	۵ (۲۶/۳)
۶ آنتی بیوتیک	۴۷ (۲۷)	۲۰ (۴۲/۵)	۱۶ (۳۴)	۱۱ (۲۳/۴)
۷ آنتی بیوتیک	۶۶ (۳۷/۹)	۲۷ (۴۱)	۲۴ (۳۶/۳)	۱۵ (۲۲/۷)

می‌شود. ژن *mecA* قسمتی از یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی SCCmec است (۵). این عنصر ژنی در گونه‌های حساس به متی‌سیلین وجود ندارد. در ضمن چون منطقه ژنی ذکر شده قدرت جذب دیگر ژن‌های مقاومت را نیز دارد، بنابراین این، اعضاء توانایی لازم برای بقا و کلونیزه شدن در بیمارستان‌ها را می‌یابند (۲۱).

مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت در بیمارستان‌های مورد تحقیق به ۴۳/۵ درصد رسیده است. عواملی که می‌تواند روی شیوع MRSA در کشورهای مختلف موثر باشد شامل سیاست‌های مختلف در اجرای برنامه کنترل عفونت میزان و چگونگی تجویز آنتی‌بیوتیک، جمعیت، نوع یا تایپ سویه غالب و در نهایت به روش مورد استفاده در آزمایشگاه جهت تشخیص استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین بستگی دارد. عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاله‌ای منتشر کردند که در آن شیوع استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین را در کل مقالات منتشر شده در ایران بررسی نمودند. بر طبق یافته‌های این تحقیق تاکنون ۲۶۹۰ مقاله و یا خلاصه مقاله در ارتباط با MRSA در ایران منتشر شده است که در این مقاله ۷۴۶۴ نمونه استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی ژنتیکی (*mecA*) قرار گرفته است. بر طبق تحقیق انجام گرفته شیوع MRSA از ۲۰ تا ۹۰ درصد متفاوت بوده است ولی میانگین شیوع آن در تهران ۵۲ درصد بود (۲۲). بنابر این با توجه به اهمیت بیماری‌زایی و بالا رفتن شیوع مقاومت به متی‌سیلین در سال‌های اخیر، مطالعه دوره‌ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضرورت دارد. در مطالعه ایمان عینی و همکارانش که در سال ۲۰۱۳ روی ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی در تهران انجام شد، ۶۳/۶ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن *mecA* تشخیص داده شدند (۲۳).

در کشورهای مختلف مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین سویه‌های استافیلوکوک اورئوس رایج می‌باشد. مقاومت به جنتامایسین دارای اهمیت کلینیکی بالایی



تصویر شماره ۲: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن *aac(6)-Ie/aph(2)* (قطعه ۲۲۲ جفت بازی) به وسیله PCR
M: لدر ۱۰۰ bp
P: کنترل مثبت ATCC43300
N: کنترل منفی
ردیف ۱ تا ۴: نمونه بالینی

بحث

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به طور فزاینده‌ای در سرتاسر جهان شیوع پیدا کرده است. شناسایی سریع و دقیق MRSA، برای کمک به پزشکان و انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و جلوگیری از گسترش این گونه مورد نیاز است (۱۷). استافیلوکوک اورئوس در طی چند دهه گذشته مبدل به شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی شده است (۱۸، ۱۹). یکی از عوامل موفقیت این باکتری، کسب فاکتورهای مقاومت می‌باشد. بدین صورت که با ورود هر آنتی‌بیوتیک جدید، سویه‌های مقاوم باکتری به سرعت ظهور یافته‌اند و درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری را با دشواری مواجه کرده‌اند. به عنوان مثال با ورود پنی‌سیلین به بازار و استفاده از این دارو در درمان بیماران بستری به سرعت سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین ظاهر گشتند (۲۰). مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین به دلیل کسب ژن ترانس‌پیتیداز جدید به نام PBP² در استافیلوکوک اورئوس است که تمایل بسیار کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام دارد. ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین *mecA* است که این ژن بر روی کروموزوم حمل می‌شود و باعث تبدیل PBP به PBP^{2a}

می‌باشد. زیرا می‌تواند با اثرات درمانی این عوامل ضد میکروبی سازش نماید و اغلب در ترکیب با یک بتالاکتام و یا یک گلیکوپتید به‌ویژه در درمان اندوکاردیت‌های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۴). حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس نسبت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی می‌باشد. گونه‌هایی که ژن $aac(6')-Ia/aph(2'')$ را نگهداری می‌کردند کدکننده آنزیم $AAC(6')-APH(2'')$ و حتی همه آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به خاطر مقاومت به جنتامایسین مورد توجه قرار گرفتند (۳۵،۳۴،۱۶). در این مطالعه با روش دیسک دیفیوژن مقاومت به جنتامایسین ۷۴/۱ درصد برآورد شد و میزان مقاومت به ژن $aac(6')/aph(2'')$ با استفاده از ردیابی ژن توسط روش PCR ۷۷ درصد بود. نتایج مطالعات مختلف در سایر کشورها نشان داد که ژن $aac(6')/aph(2'')$ فرآوان‌ترین ژن کدکننده آنزیم‌های AME در ایزوله‌های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است (۱۶). هم‌چنین طی مطالعه‌ای که توسط Choi و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره جنوبی انجام شد، نتایج مشابهی به‌دست آمد بدین صورت که ژن $aac(6')/aph(2'')$ با فراوانی ۶۵ درصد شایع‌ترین ژن در میان ایزوله‌های مورد مطالعه بود و بعد از آن ژن‌های $ant(4')-Ia$ و $aph(3')-IIIa$ بترتیب با فراوانی ۴۱ و ۹ درصد شناسایی شدند (۳۲). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Nurittin و همکارانش صورت گرفت، درصد حضور ژن $aac(6')/Aph(2'')$ در ۶۶ درصد از استافیلوکوک ارئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین مشاهده شد به دنبال آن ژن $Ant(4)-Ia$ و $Aph(IIIa)$ به ترتیب با ۲۴ و ۸ درصد مشاهده شد (۳۶). که مشابه نتیجه به‌دست آمده در مطالعه Choi بود. و در مقابل تحقیقی که Ida و همکارانش در سال ۲۰۰۱ روی ۳۸۱ ایزوله بالینی در ژاپن انجام دادند شیوع ژن $Ant(4)-Ia$ ۸۴/۵ درصد گزارش شد که خیلی بیش‌تر از دو ژن دیگر $aac(6')/Aph(2'')$ ۶۱،۷٪ و $Aph(IIIa)$ ۸،۹ درصد بود (۳۸). مطالعه‌ای که عباس یادگار و همکارانش

سال ۱۳۸۸ بر روی ۱۰۰ ایزوله به‌دست آمده در بیمارستان شریعتی و بقیه الله تهران داشتند ۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن $ant(4')-Ia$ مثبت بودند. در تحقیق فوق ژن $ant(4')-Ia$ بیش‌ترین فراوانی را داشت (۱۳). در حالی که در تحقیق حاضر نتایج مشابهی با آنچه ارائه شد به‌دست آمد به‌طوری که ژن $aac(6')/aph(2'')$ با ۷۷ درصد بیش‌ترین فراوانی را داشت. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد ژن‌های مختلف ایجادکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی می‌توانند در کلون‌های مختلف MRSA در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت باشند (۳۷).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش چشمگیری در شیوع استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین در سطح جهان مشاهده شده است. پیشرفت مقاومت چندگانه به آمینوگلیکوزیدها و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌هایی که MRSA هستند دیده شده. در این مطالعه اهمیت واژه مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و ظهور مقاومت به متی‌سیلین نشان داده شده. و اما سرعت و شیوع پیشرفت مقاومت، وابسته به نحوه مصرف آنتی‌بیوتیک در بیمارستان‌های مناطق مختلف است. و شاید بتوان نتیجه گرفت که ژن $aac(6')/aph(2'')$ میزان مقاومت آمینوگلیکوزیدی بیش‌تری را کد میکند. هم‌چنین در مناطق جغرافیایی مثل ایران در استان‌های مختلف ژن‌های متفاوتی ممکن است علت بروز این مقاومت باشند که می‌تواند بیانگر این مساله باشد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خانواده آمینوگلیکوزید و هم‌چنین مدت زمان استفاده در بیماران مختلف شاید به نوعی در بیان مقاومت موثر باشد. در نتیجه سرعت تشخیص عفونت وابسته به MRSA و دیگر ایزوله‌های مشکل‌ساز بیمارستانی و تشخیص و درمان صحیح و به‌موقع مهم‌ترین امر در اپیدمیولوژی هستند. بنابراین زمانی که درمان عفونت MRSA در بیمارستان‌هایی که امکان انجام مطالعات مولکولی در آن وجود ندارد در حال برنامه‌ریزی می‌باشد نباید نرخ بالای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را نادیده گرفت.

References

1. Al-Khulaifi Manal M, Amin Aref Nagwa M, Al Salamah AA. Phage typing, PCR amplification for *mecA* gene, and antibiotic resistance patterns as epidemiologic markers in nosocomial outbreaks of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi J Biol Sci* 2009; 16(1): 37-49.
2. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, McTavish SM, Kearns A, Coates A. Combinations of β -lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2015; 10(2): e0117664.
3. Pillai MM, Latha R, Sarkar G. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction and conventional methods: a comparative study. *J Lab Physicians* 2012; 4(2): 83-88.
4. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 2007; 90(3): 1176-1185.
5. Suhaili Z, Azmi Johari S, Mohtar M, Rushdi Tan Abdullah A, Ahmad A, Manaf AliJi Y A. Detection of Malaysian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates using simplex and duplex real-time PCR. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25: 253-258.
6. Ji Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols. Preface. *Methods Mol Biol* 2007; 391: v.
7. Gade Neeta D, Qazi Mohiuddin Recent trend of aminoglycoside resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in tertiary care hospital. *Journal of Laboratory Physicians Materials and Methods* 2014; 6(6): 94-96.
8. Edson R, Terrell C. The aminoglycosides. *Mayo.C/in. Proc* 1991; 66(1): 158-164.
9. Schmitz F, Fluit C, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 43: 253-259.
10. Oyebo A, Terry A, Olusoga D, Bamigboye K, Animasaun D, Oluremi A. Distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes amongst methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from Nigerian hospitals. *African Journal of Microbiology Research* 2015; 9(5): 318-325.
11. Hadadi A, Moradi-Tabriz H, Mehdipour B, Moslehi B, Esmailzadeh P. Determining the prevalence of methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* by MIC and E-Test. *Tehran Univ Med J* 2011; 69(6): 344-351 (Persian).
12. Clinical Laboratory Standards Institute; Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty first informational supplement CLSI 2011; Vol.31 No1.
13. Yadegar A, Satri M, Mozafari N, Gudarzi Gh. Pervalence ant(4')-Ia gene among nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex-PCR. *Jornal of medicin science Modares* 2010; 1: 59-68.
14. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous- DNA-based assays for rapid

identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 618-623.

15. 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.
16. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen H, Eleonora H. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. *J Med Microbiol* 1994; 41: 282-290.
17. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iran J Microbiol* 2014; 163-168.
18. Havaei SA, Azimian A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Mirab Samiee S, et al. Isolation of Asian endemic and livestock associated clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from ocular samples in Northeastern Iran. *Iran J Microbiol* 2013; 5: 227-232.
19. Hasani A, Sheikhalizadeh V, Naghili B, Valizadeh V, Nikoonijad AR. Methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*: Appraising therapeutic approaches in the Northwest of Iran. *Iran J Microbiol* 2013; 5: 56-62.
20. Kikuchi K. Overview and strategy for methicillin resistant bacteria. *Jpn J Med Assoc* 2002; 127: 347-353.
21. Fateh Manesh P. taene ekhtesasi *Staphylococcus aureus* haye moghavem be methicillin az tarighe PCR gene mecA hamgam ba pagohesh haye daneshgahi. *Newspaper Resalat* 2006; 5960: 19.
22. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderinasab M. Epidemiology of mecA-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(5): 1010-1019.
23. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, et al. distribution of genes encoding tetracyclin resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Annals of Burns and Fire Disasters* 2013; vol. XXVI n. 2.
24. Sabath LD. Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; 97(3): 339-344.
25. Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10(2): 95105.
26. Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(11): 297786.
27. Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycingentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(6): 15345.
28. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycosideresistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol* 2008; 56(6): 55862.
29. Wright GD. Aminoglycoside modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(5): 499-503.

30. Brown NM, Reeves DS. Mechanisms and epidemiology of aminoglycoside resistance. *J Med Microbiol* 1992; 36: 11-14.
31. Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 1994; 31(1): 12-20.
32. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, 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): 631-636.
33. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57(1): 138-163.
34. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrob Agent Chemother* 1990; 34: 2164-2168.
35. Udo EE, Dashti AA. Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. *Int J Antimicrob Agent* 2000; 13: 273-279.
36. Nurittin A, Baris S, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiological Research* 2006; 161(1): 49-54.
37. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycosidemodifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 311-521.