

Frequency of the Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Staphylococcus Aureus* Isolated from Hospitalized Burn Patients

Seyed Ali Asghar Malek Hosseini¹,
Seyed Sajjad Khoramrooz²,
Masoud Marashifard³,
Najmeh Parhizgari^{3,4},
Fariba Mansouri⁵

¹ BSc in Laboratory Sciences, Student Research Committee, Faculty of Paramedicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

² Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

³ PhD Student in Medical Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ PhD Student in Medical Virology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁵ MSc Student in Microbiology, Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Yasooj Branch, Yasooj, Iran

(Received September 21, 2015 Accepted November 30, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is one of the most common nosocomial pathogens especially among burn patients. Aminoglycoside is usually used in combination with other antibiotics for treatment of serious *S. aureus* infections. Resistance to aminoglycoside antibiotics is one of the most important problems in treatment of *S. aureus* infections. The aim of the present study was to determine the frequency of aminoglycoside resistance genes in *S. aureus* isolated from burn patients.

Materials and methods: A total of 81 isolates of *S. aureus* were collected from burn wounds of patients hospitalized in Taleghani hospital in Ahvaz, Iran. Conventional laboratory tests were used for identification of *S. aureus* at species level and then confirmed by detection of *nucA* gene. Antimicrobial susceptibility pattern was tested against 11 different antibiotics by Disc Agar Diffusion Method. Frequency of aminoglycoside resistance genes (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-I, *aph(3')-IIIa*, and *ant(4')-Ia*) were evaluated by multiplex-PCR method.

Results: Highest rate of resistance were observed against Penicillin (97.53%), Erythromycin (77.78%) and Ciprofloxacin (76.54%). None of the isolates were resistant to Vancomycin. MRSA detection rate was 87.65%. In isolates that showed resistance to Aminoglycosides, 28.57% have only *aac(6')-Ie-aph(2'')*-I gene and 46.03% have both *aac(6')-Ie-aph(2'')*-I and *aph(3')-IIIa* genes simultaneously. None of the isolates were positive for *ant(4')-Ia* gene.

Conclusion: Considering the high prevalence of MRSA isolates and also aminoglycoside resistance gene in *S. aureus*, continuous surveillance in infection control policy is necessary in hospitals to prevent resistant bacteria spreading.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, burn patients, MRSA, aminoglycoside resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(134): 147-157 (Persian).

فراوانی ژن های کد کننده ی آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران بستری در بخش سوختگی در جنوب غربی ایران

سید علی اصغر ملک حسینی^۱

سید سجاد خرم روز^۲

مسعود مرعشی فرد^۳

نجمه پرهیزگاری^{۳و۴}

فریبا منصوری^۵

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس از مهم ترین پاتوژن های بیمارستانی در بیماران سوختگی محسوب می گردد. یکی از مهم ترین مشکلات در ارتباط با درمان عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی است. هدف از مطالعه ی حاضر تعیین فراوانی ژن های کد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۸۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه سوختگی بیماران بستری شده در بیمارستان طالقانی شهر اهواز جمع آوری گردید. برای بررسی مقاومت به متی سیلین، از روش ملکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و تکثیر ژن *mecA* استفاده گردید. الگوی حساسیت ضد میکروبی ایزوله ها به ۱۱ آنتی بیوتیک با روش دیسک آگار دیفیوژن مختلف بررسی شد. فراوانی ژن های کد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی *I-aph(2'')-Ie-aac(6')*، *IIIa-aph(3')* و *Ia-ant(4')* با استفاده از روش multiplex-PCR بررسی گردید.

یافته ها: بیش ترین میزان مقاومت به پنی سیلین (۹۷/۵۳ درصد)، اریترومايسين (۷۷/۷۸ درصد) و سپیروفلوکساسین (۷۶/۵۴ درصد) دیده شد. هیچ کدام از ایزوله ها به ونکومايسين مقاوم نبودند. ۸۷/۶۵ درصد ایزوله ها مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند. در بین ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* بالاترین میزان فراوانی را داشت، به طوری که از ۶۳ ایزوله مقاوم، ۴۶/۰۳ درصد به طور هم زمان دارای ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* و ژن *IIIa-aph(3')* بودند و ۲۸/۵۷ درصد فقط دارای ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* بودند. ژن *Ia-ant(4')* در هیچ کدام از این ایزوله ها یافت نشد.

استنتاج: با توجه به فراوانی بالای ایزوله های MRSA و هم چنین درصد بالای ژن های کد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از منابع بیمارستانی، نظارت مستمر بر فرایندهای کنترل عفونت بیمارستان جهت جلوگیری از گسترش باکتری های مقاوم در محیط و انتقال آن به بیماران ضروری است.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاوم به متی سیلین، بخش سوختگی، مقاومت آمینوگلیکوزیدی

مقدمه

گسترش سریع مقاومت ضد میکروبی در آن و ایجاد طیف گسترده ای از عفونت ها از قبیل باکتری، پنومونی

استافیلوکوکوس اورئوس از رایج ترین پاتوژن های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی می باشد که به دلیل

E-mail: khoramrooz@gmail.com

مؤلف مسئول: سیدسجاد خرم روز - یاسوج: دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

۱. دانش آموخته رشته علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی ویروس شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. دانشجوی دکتری تخصصی ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۵. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۶/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۹

بیمارستانی، اندوکاردیت، سندروم شوک سمی، استئومیلیت، آبسه‌ها و عفونت‌های پوست و بافت نرم در بیماران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵-۱). بیماران دچار سوختگی و بستری در بیمارستان، مستعد عفونت‌های ناشی از این باکتری هستند که به علت تخریب ساختار پوست و سدهای دفاعی ایمنی ذاتی در معرض عفونت‌های شدید، جدی و خطرناک هستند که در بعضی از موارد، منجر به مرگ در این بیماران می‌شود (۴، ۶، ۷). *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) یکی از مهم‌ترین مشکلات و چالش‌های جدی در بخش سوختگی می‌باشد، به طوری که پس از *سودوموناس ایروجینوزا* جزء پاتوژن‌های شایع در عفونت‌های سوختگی است (۸). این سویه‌ها با داشتن ژن *mecA* که پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin Binding Protein 2a: PBP2a) را کد می‌کند، به متی‌سیلین مقاوم می‌شوند (۶). هم‌چنین این ایزوله‌های MRSA به سایر آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مقاومت نشان داده‌اند (۹). علاوه بر این، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ایزوله‌های MRSA به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر از جمله گروه آمینوگلیکوزیدی نیز مقاومت بالایی را نشان می‌دهند که علت آن حمل ژن‌های کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی در همراهی ژن *mecA* می‌باشد که روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها (عناصر ژنتیکی متحرک) کد می‌شوند (۱۰-۱۲). به علاوه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به ونکومایسین، فلوروکینولون‌ها، ماکرولیدها، کلیندامایسین و ریفامپین در مطالعات مختلف و در نمونه‌های کلینیکی متفاوت مشاهده شده است (۱۳-۱۶).

آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهم و با طیف گسترده هستند که به دلیل قدرت کشندگی سریع و شدید و عملکرد سینرژیکی، همراه با آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر بتالاکتام و گلیکوپپتیدها در درمان عفونت‌های

بیمارستانی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۷، ۱۸). متأسفانه، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی همانند دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها به مشکلی نگران‌کننده و جدی در سرتاسر جهان و در میان بیماران سوختگی تبدیل شده است (۶، ۹). آمینوگلیکوزیدها، با اتصال به جزء ریبوزومی 30S از سنتز پروتئین در باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند (۱۹). بر اساس مطالعات چند سال اخیر، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت بالایی نسبت به آمینوگلیکوزیدها نشان داده‌اند. از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که در مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نقش دارند، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی اند که شامل *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa*، *aac(6')-Ie-aph(2'')*-I هستند (۱۷، ۲۰).

آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی (Aminoglycoside Modifyng Enzymes: AMEs) در ۴ کلاس اصلی ترانسیتیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-acetyltransferases: AACs)، فسفو ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferases: APHs)، نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferases: ANTs) و آدنیل استیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-adenyltransferases) دسته‌بندی می‌شوند و با غیرفعال‌سازی دارو منجر به مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های این گروه می‌شوند (۲۱). سه گروه از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع کلینیکی اهمیت بیش‌تری دارند که شامل *AAC(6')/APH(2'')*، *ANT(4')-I* و *APH(3')-III* می‌باشند و سبب مقاومت به کانامایسین، آمیکاسین و نتومایسین می‌گردند. *ANT(4')-I* سبب مقاومت به توبرامایسین و *AAC(6')/APH(2'')* که شایع‌ترین آنزیم تغییردهنده

آمینوگلیکوزیدی است، علاوه بر توبرامایسین سبب مقاومت به جنتامایسین نیز می شود (۲۲،۲۱). با توجه به اهمیت ویژه استافیلوکوکوس اورئوس و به خصوص ایزوله های MRSA و عفونت های مرتبط با آن در بیماران سوختگی و هم چنین کاربرد زیاد آنتی بیوتیک هایی نظیر آمیکاسین، توبرامایسین و جنتامایسین در درمان عفونت های بالینی و هم چنین سوختگی و نظر به اهمیت ژن های AMEs در مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از یک طرف و اطلاعات کم در مورد شیوع و تایپ های غالب آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی در جنوب ایران از طرف دیگر، این مطالعه با هدف بررسی و تعیین فراوانی تایپ های مختلف ژن های *aac(6')-Ie-aph(2'')* و *ant(4')-Ia* و *aph(3')-IIIa* در بیمارستان سوختگی طالقانی (شهر اهواز صورت گرفت).

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی - مقطعی بر روی ۲۰۰ بیمار دارای عفونت سوختگی که به مدت بیش از ۴۸ ساعت در بخش های مردان، زنان، ICU و نوزادان بیمارستان طالقانی (بیمارستان سوختگی شهر اهواز) در فاصله زمانی اردیبهشت ۱۳۹۰ تا بهمن ۱۳۹۱ بستری شده بودند، انجام شد. تعداد ۸۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس غیر تکراری پس از جداسازی اولیه بر روی مانیتول سالت آگار با تست های تشخیصی رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کوآگولاز لوله ای و DNase شناسایی شدند. تایید نهایی باکتری با روش ملکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) و تکثیر ژن *nucA* انجام گرفت (۲۳). شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین (MRSA) با روش ملکولی و تکثیر ژن *mecA* انجام شد (۲۴).

برای بررسی میزان مقاومت ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین (۱۰ واحد)، سیروفلوکساسین (۵ μg)، ریفامپیسین (۵ μg)، سفوتاکسیم

(۳۰ μg)، کلیندامایسین (۲ μg)، کلرامفنیکول (۳۰ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg) و در گروه آمینوگلیکوزیدی، از جنتامایسین (۱۰ μg)، توبرامایسین (۱۰ μg) و آمیکاسین (۳۰ μg) از دیسک های آنتی بیوتیک ساخت کشور هند (های مدیا) و بر اساس راهنمای موسسه استاندارد آزمایشگاهی بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) (۲۵) و با روش دیسک آگار دیفیوژن (Disk Agar Diffusion: DAD) صورت پذیرفت. هم چنین جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی ونکومایسین از روش E-test (AB BIODISK, Sweden) استفاده شد.

به منظور شناسایی ژن های کد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی ابتدا DNA باکتری ها با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) استخراج شد (۲۶). به طور خلاصه، ابتدا غلظتی معادل نیم مک فارلند از باکتری تهیه و ۳۰۰ میکرولیتر از آن را به تیوب های اپندورف ۱/۵ سی سی انتقال داده و درون بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد به صورت شناور در راک های مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و سپس تیوب ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را که حاوی DNA مکمل بود، به تیوب های اپندورف ۰/۵ سی سی انتقال داده شد و در ۲۰- درجه سانتی گراد برای انجام کار مولکولی نگهداری شد. لازم به ذکر است همه مراحل در شرایط استریل و در تیوب های استریل انجام پذیرفت. جهت شناسایی و تکثیر ژن های کد کننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aac(6')-Ie-aph(2'')* و *ant(4')-Ia* از پرایمرهای ذکر شده در مطالعات پیشین، ارائه شده در جدول شماره ۱ استفاده شد.

برای انجام واکنش multiplex-PCR، مخلوط واکنش جهت ژن های کد کننده آمینوگلیکوزیدی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (آپلیکون، دانمارک)، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۵ میکرولیتر DNA مکمل و ۱/۵ میکرولیتر

آب مقطر دیونیزه انجام شد. در واکنش دیگر برای شناسایی ژن *mecA* در حجم ۲۵ میکرولیتر و ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون دانمارک) ۱۰ پیکومول از پرایمر، ۵ میکرولیتر DNA مکمل و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده گردید. شرایط دمایی واکنش PCR در دستگاه BioRad T100 USA در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است. پس از پایان واکنش، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز و برای مشاهده باندها از دستگاه عکس برداری ژل (میجرساینس، تایوان) استفاده شد.

در این مطالعه، داده‌های آماری در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ وارد شد و با استفاده از روش‌های آماری توصیفی و هم‌چنین آزمون مربع کای (Chi-squared test) تجزیه و تحلیل شدند. سطح معناداری نیز $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر که بر روی ۸۱ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زخم سوختگی بیماران انجام گرفت، ۲۰ ایزوله (۲۴/۶۹ درصد) از نمونه‌ها مربوط به جنس مونث و ۶۱ ایزوله (۷۵/۳۱)

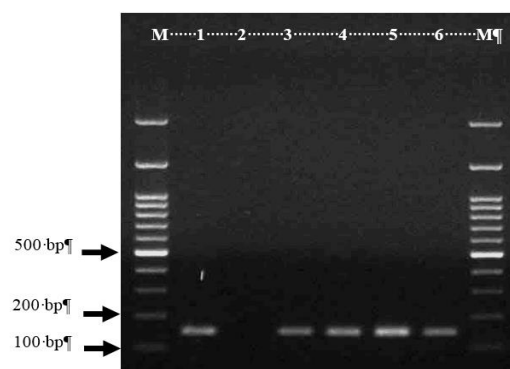
درصد) مربوط به جنس مذکر بودند. پراکنش باکتری در بخش‌های بستری، ۴۱ ایزوله (۵۰/۶۲ درصد) از بخش مردان، ۲۵ ایزوله (۳۰/۸۶ درصد) از بخش نوزادان، ۱۱ ایزوله (۱۳/۵۸ درصد) از بخش زنان و ۴ ایزوله (۴/۹۴ درصد) از بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive Care Unit: ICU) شناسایی شدند. در ارزیابی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نظر مقاومت به متی‌سیلین با روش ملکولی PCR، ۷۱ ایزوله (۸۷/۶۵ درصد) دارای ژن *mecA* و MRSA تشخیص داده شدند (تصویر شماره ۱). از ۸۱ ایزوله مورد مطالعه، ۶۲ ایزوله (۷۶/۵۴ درصد) نسبت به هر سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین مقاومت نشان دادند، در حالی که در یک ایزوله فقط به جنتامایسین و توبرامایسین مقاومت دیده شد. تمام ایزوله‌های مقاوم به جنتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین از گروه استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین بودند، در حالی که در هیچ کدام از استافیلوکوکوس اورئوس‌های حساس به متی‌سیلین (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*: MSSA)، مقاومتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد اشاره مشاهده نگردید ($p=0/0001$).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر PCR ژن‌های مقاومت آمینو گلیکوزیدی و ژن مقاومت به متی‌سیلین به همراه اندازه‌ی قطعات

نام ژن	پرایمرها (5'-3')	اندازه قطعه تکثیر شده (جفت باز)	منبع
<i>mecA</i>	F-GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT R-ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	۱۴۷	۲۲
<i>aac(6)-Ie-aph(2)-I</i>	F-CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG R-CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	۳۶۹	۴
<i>aph(3)-IIIa</i>	F-GGCTAAAATGAGAATATCACCCG R-CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	۵۲۳	۴
<i>ant(4)-Ia</i>	F-CAAAGTCTAAATCGGTAGAAGCC R-GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	۲۹۴	۴

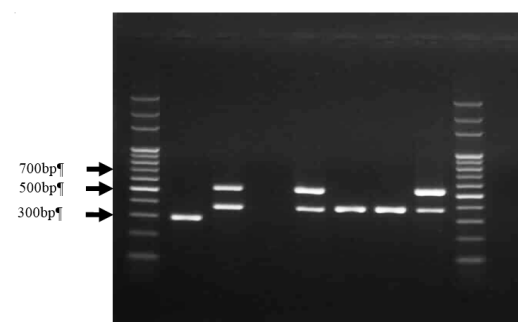
جدول شماره ۲: سیکل‌ها و دماها برای تکثیر ژن‌های مقاومت آمینو گلیکوزیدی و ژن مقاومت به متی‌سیلین با روش PCR

ژن	دنا تراسیون اولیه	تکثیر	اتصال پرایمر	دنا تراسیون تکثیر نهایی
<i>mecA</i>	۹۴°C (۴min)	۷۲°C (۱min)	۹۴°C (۴۰ S) ۵۶°C (۴۰ S)	۷۲°C (۵min)
Multiplex PCR of <i>aac(6)-Ie-aph(2)-I aph(3)-IIIa ant(4)-Ia</i>	۹۴°C (۴min)	۷۲°C (۱min)	۹۴°C (۴۰ S) ۵۶°C (۴۰ S)	۷۲°C (۵min)



تصویر شماره ۱: محصولات واکنش PCR مربوط به ژن *mecA*: نشان دهنده وزن مولکولی DNA، شماره ۱ کنترل مثبت با وزن ۱۴۸ جفت باز، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳-۶ نمونه های بالینی دارای ژن *mecA*

میزان مقاومت ایزوله ها به آنتی بیوتیک های پنی سیلین ۹۷/۵۳ درصد، سفوتاکسیم ۶۴/۲۰ درصد، اریترومايسين ۷۷/۷۸ درصد، سیپروفلوکساسین ۷۶/۵۴ درصد، کلیندامایسین ۳/۷۰ درصد و کلرامفنیکول نیز ۲/۴۷ درصد بود. لازم به ذکر است که هیچ مقاومتی به ونکومايسين مشاهده نگردید و در رابطه با ریفامپین به ترتیب ۱۳/۵۸ درصد ایزوله ها مقاوم و ۳۳/۳۳ درصد حد واسط بودند.



تصویر شماره ۲: محصولات واکنش PCR مربوط به ژن های کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی: M نشان دهنده وزن مولکولی DNA، شماره ۱ کنترل مثبت ژن *ant(4')-Ia* با وزن ۲۹۴ جفت باز، شماره ۲ کنترل مثبت ژن *aph(3')-IIIa* (۵۲۳ جفت باز) و ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')* (۳۶۹ جفت باز)، شماره ۳ کنترل منفی، شماره ۴ و ۷ سویه بالینی دارای ژن های *aac(6')-Ie-aph(2'')* و *aph(3')-IIIa* شماره ۵ و ۶ سویه های بالینی دارای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')*

فراوانی ژن های *aac(6')-Ie-aph(2'')* با روش multiplex-PCR در ایزوله های مورد بررسی در جدول شماره ۳ آمده است. تصویر شماره ۲ نشان دهنده حرکت محصول PCR حاصل از تکثیر بر روی ژل آگارز می باشد. مطابق جدول در بین ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')* بالاترین میزان فراوانی را داشت، به طوری که از ۶۳ ایزوله مقاوم، ۷۴/۶۰ درصد دارای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')* بودند و در میان آن ها، ۴۶/۰۳ درصد علاوه بر این ژن، دارای ژن *aph(3')-IIIa* و ۲۸/۵۷ درصد فقط دارای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')* بودند. ژن *ant(4')-Ia* نیز در هیچ کدام از این ایزوله ها یافت نشد. در جدول شماره ۴ نیز فراوانی نسبی این ژن ها در کل ایزوله ها و ایزوله های MRSA آمده است.

بحث

در ۷۱ ایزوله MRSA این مطالعه، ۸۷/۷۳ درصد ایزوله ها همزمان به جنتامایسین، آمیکاسین و اریترومايسين مقاوم بودند. هم چنین مقاومت به توبرامایسین و سیپروفلوکساسین هر کدام ۸۷/۳۲ درصد و پنی سیلین ۹۸/۶ درصد بود، در حالی که کم ترین مقاومت به کلیندامایسین (۴/۲۲ درصد) و کلرامفنیکول (۲/۸۱ درصد) مشاهده گردید. لازم به ذکر است که هیچ کدام از این ایزوله ها به ونکومايسين مقاوم نبودند و در رابطه با ریفامپین به ترتیب ۱۵/۵ درصد ایزوله ها مقاوم و ۳۸/۰۳ درصد در گروه حد واسط بودند. ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها به جز در یک مورد که فقط به جنتامایسین و توبرامایسین مقاومت داشت، در سایر ایزوله ها به طور همزمان به جنتامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین مقاومت نشان دادند و همه آن ها از استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین بودند.

I-aph(2'')-Ie-aac(6') بالاترین میزان فراوانی را داشت، به طوری که از ۶۳ ایزوله مقاوم، ۴۶/۰۳ درصد به طور هم زمان دارای ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* و ژن *IIIa-aph(3')* بودند و ۲۸/۵۷ درصد فقط دارای ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* بودند. ژن *Ia-ant(4')* در هیچ کدام از این ایزوله‌ها یافت نشد. هر دو ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* و *Ia-ant(4')* می‌توانند سبب مقاومت به توبرامایسین شوند، ولی ژن *IIIa-aph(3')* در مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نقشی ندارد (۱۷). با توجه به این که در ۶۳ ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، ۱۸ (۲۸/۵۷ درصد) ایزوله دارای ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* و فاقد ژن *Ia-ant(4')* به توبرامایسین مقاوم بودند، تاثیر ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* در مقاومت این ایزوله‌ها نسبت به توبرامایسین محتمل به نظر می‌رسد، هر چند ممکن است که دو مکانیسم دیگر مرتبط با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی شامل تغییر در جایگاه اتصال دارو به ریبوزوم و کاهش در نفوذپذیری دارو در آن نیز نقش داشته باشند. هم‌چنین ۱۶ ایزوله که به هر سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و توبرامایسین و آمیکاسین

به علاوه مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مورد استفاده در این مطالعه در ایزوله‌های MSSA مشاهده نگردید. در همراهی با نتایج این مطالعه، مطالعات دیگر نیز ارتباط میان مقاومت به متی‌سلین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی را نشان داده‌اند (۱۱، ۱۲، ۱۹، ۲۱، ۲۲). در مطالعه محمدی و همکاران در ۶ بیمارستان مختلف از غرب کشور در ایزوله‌های MRSA، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین ۱۰۰ درصد بود که با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی دارد، ولی مقاومت به اریترومایسین ۵۰ درصد، جنتامایسین ۱۸ درصد، توبرامایسین ۱۸ درصد، آمیکاسین ۱۷ درصد و ریفامپین ۱۴ درصد بودند که کم‌تر از مطالعه حاضر و در کلیندامایسین (۲۷ درصد) بیش‌تر از مطالعه حاضر در ایزوله‌های MRSA بود. در مشابهت با مطالعه حاضر، میزان مقاومت به ونکومایسین ۰ درصد گزارش شد (۳). مهم‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در *استافیلوکوکوس ارئوس* حضور ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* است (۲۷) که در این مطالعه نتایج مشابهی یافت شد. در تحقیق حاضر در بین ایزوله‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها، ژن

جدول شماره ۳: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تغییردهنده‌ی آمینوگلیکوزیدی در *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از سوختگی

الگوی مقاومت	ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی			تعداد (درصد)	بخش بستری			نوزادان
	<i>IIIa-aph(3')</i>	<i>I-aph(2'')-Ie-aac(6')</i>	<i>Ia-ant(4')</i>		مردان	زنان	ICU	
Gm ^R , T ^R , A ^R	-	-	-	۱۶ (۱۹/۷۵)	۶	۴	۱	۵
	-	+	-	۱۸ (۲۲/۲۲)	۶	۲	۱	۹
	+	+	-	۲۸ (۳۴/۵۷)	۱۹	۲	۱	۶
Gm ^R , T ^R , A ^S	+	+	-	۱ (۱/۲۴)	۱	۰	۰	۰
	-	-	-	۱۸ (۲۲/۲۲)	۹	۳	۱	۵
جمع کل	۲۹ (۳۵/۸۰)	۴۷ (۵۸/۰۲)	۰ (۰)	۸۱ (۱۰۰)	۴۱	۱۱	۴	۲۵

Gm, Gentamicin; T, Tobramycin; A, Amikacin. R, resistant; I, intermediate; S, sensitive to the antibiotic.

جدول شماره ۴: فراوانی نسبی ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیماران سوختگی

نام ژن	ایزوله‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها	ایزوله‌های مقاوم به متی‌سلین (MRSA)	کل ایزوله‌ها	ایزوله‌های حساس به متی‌سلین (MSSA)
	تعداد ایزوله = ۶۳ (درصد) تعداد	تعداد ایزوله = ۷۱ (درصد) تعداد	تعداد ایزوله = ۸۱ (درصد) تعداد	تعداد ایزوله = ۱۰ (درصد) تعداد
<i>I-aph(2'')-Ie-aac(6')</i> فقط دارای	۱۸ (۲۸/۵۷)	۱۸ (۲۵/۳۵)	۱۸ (۲۲/۲۲)	۰
<i>I-aph(2'')-Ie-aac(6')</i> و <i>IIIa-aph(3')</i> حضور همزمان	۲۹ (۴۶/۰۳)	۲۹ (۴۰/۸۵)	۲۹ (۳۵/۸۰)	۰
فاقد ژن مقاومت آمینوگلیکوزیدی	۱۶ (۲۵/۴)	۲۴ (۳۳/۸)	۳۴ (۴۲)	۱۰ (۱۰۰)

مقاوم بودند، فاقد هرگونه ژن کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی بودند که احتمالاً به دلیل سایر مکانیسم‌ها از جمله تغییر در نفوذپذیری پروتئین‌های غشای خارجی، تغییر در اهداف ریبوزومی آنتی‌بیوتیک و یا حتی ژن‌های کدکننده‌ی AMEs ناشناخته باشد (۲۸). در مطالعه محمدی و همکاران نیز در ۶ ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، هیچ کدام از ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی وجود نداشتند (۳).

نتایج اغلب مطالعات انجام شده بر روی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی حاکی از فراوانی متفاوت ژن‌های کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی و هم‌چنین معرفی ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* به عنوان فراوان‌ترین ژن کدکننده‌ی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در این ایزوله‌ها از جمله در کشورهای اروپایی، ایران و نیز در کشور کره جنوبی است (۱۰۳، ۱۷، ۱۹، ۲۲). به‌طوری‌که در مطالعات پیشین انجام شده بر روی ایزوله‌های MRSA توسط گودرزی در اراک، فتح‌اله‌زاده و ایمان‌عینی (۲۰۱۳) در تهران و محمدی در غرب ایران همانند مطالعه حاضر، ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* دارای بیش‌ترین فراوانی بوده و میزان فراوانی آن در این مطالعات از مطالعه حاضر بیش‌تر بوده است. ژن *Ia-ant(4')* نیز در مطالعات فوق بین ۱/۸ درصد تا ۸۶/۴۶ درصد فراوانی داشت که همگی از مطالعه حاضر (۰ درصد) بیش‌تر بودند (۲۹، ۲۰، ۴، ۳). در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *IIIa-aph(3')* در ایزوله‌های MRSA، ۴۰/۸۴ درصد بود. فراوانی این ژن در ایزوله‌های MRSA در مطالعات فتح‌اله‌زاده و ایمان‌عینی (۲۰۱۳) به ترتیب ۷۱ و ۸۰/۲۱ درصد بود که بسیار بیش‌تر از مطالعه حاضر و در مطالعات انجام شده توسط گودرزی و یادگار به ترتیب ۱۶/۹ درصد و ۶ درصد بود که بسیار کم‌تر از مطالعه حاضر بودند (۲۹، ۲۰، ۱۱، ۴).

محمدی و همکاران نیز فراوانی این ژن را ۳۸/۹ درصد گزارش می‌کند که تقریباً با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳). در مطالعه‌ی یادگار و همکاران در

تهران بر روی ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* با ۴۶ درصد، بعد از ژن *Ia-ant(4')* با ۵۸ درصد، دومین فراوانی را داشت؛ در حالی که ژن *Ia-ant(4')* در هیچ کدام از ایزوله‌های مطالعه حاضر یافت نشد (۱۱). در مطالعه‌ی ای که ابدال و همکاران در اراک بر روی ایزوله‌های بالینی MSSA انجام دادند، فراوانی ژن *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* ۱۸ درصد و ژن‌های *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* و *IIIa-aph(3')* به‌طور هم‌زمان ۱۴ درصد بود، در صورتی که در ایزوله‌های MSSA در مطالعه حاضر، هیچ کدام از ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت آمینوگلیکوزیدی مشاهده نگردید (۱۷).

در مطالعه Temiz و همکاران در ترکیه در ایزوله‌های مقاوم به آمیکاسین، فراوانی ژن‌های *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* (۴۸/۶ درصد) و *IIIa-aph(3')* (۲۸/۹ درصد) از مطالعه حاضر کم‌تر و در مورد ژن *Ia-ant(4')* (۲۶/۳ درصد) بیش‌تر بود (۱). در ۱۹۱ ایزوله MRSA بررسی شده توسط Schmitz و همکاران، میزان فراوانی ژن‌های *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* به ترتیب ۷۶، ۷ و ۵۳ درصد و در ۳۸ ایزوله‌ی MSSA بررسی شده نیز به ترتیب ۵۰، ۱۳ و ۴۲ درصد بودند. Choi و همکاران نیز در مطالعه‌ای در کره جنوبی فراوانی ژن‌های فوق را در سویه‌های MRSA به ترتیب ۸۳، ۲۱ و ۴۲ درصد و در سویه‌های MSSA به ترتیب ۵۲، ۱۴ و ۵ درصد گزارش می‌کند که ژن *IIIa-aph(3')* در ایزوله‌های MRSA این مطالعات از مطالعه حاضر بسیار کم‌تر بودند، در حالی که فراوانی سایر ژن‌ها بیش‌تر از مطالعه حاضر بود (۲۲، ۱۹). در مطالعه Hauschild و همکاران در لهستان در ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، فراوانی ژن‌های *I-aph(2'')-Ie-aac(6')* (۲۸/۹ درصد) و *IIIa-aph(3')* (۱۵/۶ درصد) از مطالعه حاضر خیلی کم‌تر و ژن *Ia-ant(4')* (۲۶/۷ درصد) خیلی بیش‌تر بود (۲). در مطالعه Ardıc و همکاران در ترکیه در

مصرف متفاوت آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مورد استفاده باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به فراوانی بالای ایزوله‌های MRSA در این مطالعه و افزایش میزان موارد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و هم‌چنین درصد بالای ژن‌های کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از منابع بیمارستانی، نظارت مستمر بر فرایندهای کنترل عفونت بیمارستان جهت جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم در محیط و انتقال آن به بیماران ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در چارچوب گرنت پژوهشی به شماره ۲-۴۵۱-۲۳ به انجام رسیده است. بدین وسیله از حمایت‌های مالی این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. 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: 544-550.
2. Hauschild T, Sacha P, Wiczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46(2): 225-228.
3. Mohammadi S, Sekawi Z, Monjezi A, Maleki M-H, Soroush S, Sadeghifard N, et al. Emergence of SCCmec type III with variable antimicrobial resistance profiles and spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthcare- and community-acquired infections in the west of Iran. *Int J Infect Dis* 2014; 25: 152-158.
4. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Khoshgnab BN, et al. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Ann Burns Fire Disasters* 2013; 26(2): 76-80.
5. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic

ایزوله‌های MRSA، فراوانی ژن *aph(3'')-IIIa* (۰ درصد) بسیار کم‌تر، ژن *ant(4'')-Ia* (۰ درصد) مشابه و ژن *I-aph(2'')-Ie-aph(6'')* (۸/۲۴ درصد) بیش‌تر از مطالعه حاضر بود (۱۲). Sekiguchi و همکاران در مطالعه‌ای در ژاپن، فراوانی ژن‌های *I-aph(2'')-Ie-aph(6'')* و *IIIa-aph(3'')* را در سویه‌های MRSA به ترتیب ۱۱/۷۱ درصد و ۰ درصد به دست آوردند که از مطالعه حاضر بسیار کم‌تر بودند (۳۰). با توجه به مطالعات پیشین ذکر شده، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و شیوع ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سایر کشورها، شهرهای مختلف ایران و حتی در بیمارستان‌های مختلف یک شهر متفاوت است. از جمله دلایل این تفاوت می‌توان منبع جداسازی ایزوله‌ها (بیماران سوختگی یا غیرسوختگی و منابع کلینیکی مختلف)، بخش محل جداسازی ایزوله‌ها در بیمارستان، شرایط جغرافیایی، ژنوتیپ باکتری اولیه وارد شده در منطقه و نیز نوع، الگو، میزان و مدت زمان

- Susceptibility Patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(2): 231-238.
6. Cook N. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus versus the burn patient. Burns 1998; 24(2): 91-98.
 7. Chen X, Yang H-h, Huangfu Y-c, Wang W-k, Liu Y, Ni Y-x, et al. Molecular epidemiologic analysis of Staphylococcus aureus isolated from four burn centers. Burns 2012; 38(5): 738-742.
 8. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. Burns 2012; 38(8): 1192-1197.
 9. Schmitz F-J, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? Int J Antimicrob Agents 1997; 9(1): 1-19.
 10. Emaneini M, Taherikalani M, Eslampour M-A, Sedaghat H, Aligholi M, Jabalameli F, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of aminoglycoside resistance in clinical isolates of staphylococci in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2009; 15(2): 129-132.
 11. 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): 109-113.
 12. 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.
 13. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Future Microbiol 2007; 2(3): 323-334.
 14. Aligholi M, Mirsalehian A, Halimi S, Imaneini H, Taherikalani M, Jabalameli F, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran. Mohajer B, Abdollahi A, Emaneini M. Med Sci Monit 2011; 17(9): 71-74.
 15. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. Lancet Infect Dis 2002; 2(9): 530-538.
 16. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34(4): 482-492.
 17. Abdal N, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. Koomesh 2014; 16(1): 82-89.
 18. Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. Curr Microbiol 2008; 56(6): 558-562.
 19. Schmitz F-J, 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; 43(2): 253-259.
 20. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani

- M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(3): 264-265.
21. 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): 701-705.
22. 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): 631-636.
23. Sahebkhari N, Nochi Z, Eslampour M, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2011; 58(2): 113-121.
24. 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*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 5026-5033.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement. M100- S21. Wayne, PA: CLSI; 2011.
26. Fatholahzadeh B, Hashemi FB, Emaneini M, Aligholi M, Nakhjavani FA, Kazemi B. Detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated from urinary tract infections (UTI) in Tehran, Iran. *Daru J Pharm Sci* 2006; 14(3)(55): 141-145.
27. Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57(1): 138-163.
28. Udo EE, Dashti AA. Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13(4): 273-279.
29. Guodarzi A, Zolfaghari MR, Rezazadeh M, Amouzandeh-Nobaveh A, Arjmandzadegan M, Ghaznavi-Rad E. Phenotypic and genotypic determination of aminoglycoside resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nosocomial infections. *Urmia Medical Journal* 2014; 24(11): 883-893.
30. Sekiguchi J-i, Fujino T, Saruta K, Konosaki H, Nishimura H, Kawana A, et al. Prevalence of erythromycin-, tetracycline-, and aminoglycoside-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Tokyo and Kumamoto. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57(2): 74-77.