

Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Clinical Specimens

Farhad Seyedi Marghaki¹,
Hossein Hosseini Nave²,
Davood Kalantar-Neyestanaki²,
Fereshteh Safaani²,
Yasser Fasihi¹,
Mohammad Moradi²

¹ MSc in Medical Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received February 25, 2016, Accepted April 30, 2017)

Abstract

Background and purpose: Aminoglycosides are broad-spectrum antibiotics that are often used in combination with other antibiotics for the treatment of severe *S. aureus* infections. This research aimed at investigating the phenotypic and genotypic evaluation of aminoglycoside resistance in clinical isolates of MRSA in Kerman, Iran.

Materials and methods: During a one year period, a total of 57 MRSA isolates was collected from 130 isolates of *S. aureus*. MRSA isolates were tested for susceptibility to 13 antimicrobial agents using disc diffusion method. Then, the presence of aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) was evaluated by multiplex polymerase chain reaction.

Results: In the MRSA isolates, high resistance rates were observed for tetracycline, erythromycin, kanamycin and gentamicin. In fact, 73.7% and 68.4% of the isolates were found to be resistant to kanamycin and gentamicin, respectively. *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *aph(3')-III*, *ant(4')-Ia*, and *aph(2'')-Id* genes were detected in 40.3%, 15.7%, 12.2%, and 3.5% of the aminoglycosides-resistant isolates, respectively.

Conclusion: The prevalence of aminoglycosides resistance among MRSA isolates is rising, therefore, identification of resistance genes in order to achieve the exact pattern of resistance is helpful in preventing the spread of resistant strains.

Keywords: methicillin- resistant *staphylococcus aureus*, aminoglycoside resistance, aminoglycoside modifying enzyme

بررسی فراوانی ژن های کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های بالینی

فرهاد سیدی مرغی¹

حسین حسینی نوه²

داود کلانتر نیستانی²

فرشته صفاری²

یاسر فصیحی¹

محمد مرادی²

چکیده

سابقه و هدف: آمینوگلیکوزیدها آنتی بیوتیک هایی با طیف اثر گسترده هستند که عمدتاً در درمان عفونت های شدید استافیلوکوک اورئوس به صورت ترکیبی با دیگر آنتی بیوتیک ها استفاده می شوند. مطالعه حاضر به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) جمع آوری شده از شهر کرمان می پردازد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی - مقطعی طی مدت یک سال از 130 ایزوله استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه های کلینیک، 57 ایزوله (MRSA) جمع آوری شد. حساسیت این ایزوله ها نسبت به 13 آنتی بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید و در نهایت حضور ژن های کد کننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها با روش Multiplex PCR ارزیابی شد.

یافته ها: در این مطالعه مقاومت بالایی نسبت به تتراسیکلین، اریترومايسين، کانامایسین و جنتامایسین در ایزوله های MRSA مشاهده گردید به طوری که به ترتیب 73/7 و 68/4 درصد از ایزوله ها به کانامایسین و جنتامایسین مقاوم بودند. ژن های $aac(6')$ از ایزوله های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها شناسایی شدند.

استنتاج: شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در میان ایزوله های MRSA در حال افزایش است. بنابراین شناسایی ژن های مقاومت به منظور دستیابی به الگوی دقیق مقاومت در جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم کمک شایانی می نماید.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها

مقدمه

بیماری ها از عفونت های خفیف پوستی تا عفونت های پیچیده و شدید مثل اندوکاردیت، پنومونی و استئومیلیت را ایجاد می کند (1). امروزه ایزوله های MRSA گسترش

استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی است که طیف گسترده ای از

Email: m_moradie@yahoo.co.uk

مؤلف مسئول: محمد مرادی - گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

1. کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

2. استادیار، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

✉ تاریخ دریافت: 1395/11/25 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/11/25 تاریخ تصویب: 1396/3/8

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی -مقطعی، مجموع 130 ایزوله استافیلوکوک اورئوس طی تاریخ فروردین 1394 تا فروردین 1395 از بیماران بستری شده و غیر بستری شهر کرمان جمع آوری شدند. ایزوله ها بر اساس آزمون های افتراقی شامل رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، تولید کواگولاز، DNase و تخمیر مانیتول تعیین هویت شدند و به عنوان ایزوله های استافیلوکوک اورئوس برای انجام آزمون های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (6). سپس ژنوم ایزوله ها با استفاده از روش استاندارد جوشاندن استخراج شد (7). تأیید نهایی ایزوله های استافیلوکوک اورئوس با استفاده از روش PCR برای ژن nuc و تعیین ایزوله های MRSA با انجام تست فنوتیپی با دیسک سفوکسیتین بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاه (CLSI) انجام شد (8، 9). حساسیت ضد میکروبی ایزوله های MRSA با استفاده از روش انتشار از دیسک (Disc diffusion) برای دیسک های آنتی بیوتیکی آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین، کانامایسین، نتیل مایسین، تری متوپریم-سولفامتو کسازول، لینزولید، کلیندامایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و ونکومایسین بر اساس توصیه نامه (CLSI) مشخص شد (9). ایزوله هایی که با انجام آنتی بیوگرام نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند برای شناسایی ژن های $\text{aph}(2'')\text{-Ib}$ ، $\text{aac}(6')\text{-Ie-aph}(2'')$ ، $\text{aph}(3')\text{-III}$ ، $\text{ant}(4')\text{-Ia}$ و $\text{aph}(2'')\text{-Ic}$ ، $\text{aph}(2'')\text{-Id}$ که از شایع ترین ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها می باشند انتخاب شدند. شناسایی این ژن ها با روش PCR Multiplex انجام گرفت (7، 10).

جهانی پیدا کرده و نه تنها در بیمارستان ها بلکه در جامعه نیز افزایش پیدا کرده اند. از طرفی این ایزوله ها مقاومت های چندگانه ای نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتا لاکتام ها، آمینو گلیکوزیدها، تتراسیکلین ها، فلوروکینولون ها و ماکرولیدها را کسب نموده اند (2).

آمینو گلیکوزیدها از اولین آنتی بیوتیک های کشف شده ای هستند که در درمان عفونت های شدید ایجاد شده توسط پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی مورد استفاده قرار گرفته اند (3). این آنتی بیوتیک ها در ترکیب با دیگر آنتی بیوتیک ها از جمله بتا لاکتام ها یا گلیکوپپتیدهایی مثل ونکومایسین اثر هم افزایی دارند لذا در درمان عفونت های شدید استافیلوکوکی به خصوص در درمان اندوکاردیت عموماً به صورت ترکیبی استفاده می شوند (4).

مکانیسم های مقاومت به این آنتی بیوتیک ها شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو، غیرفعال سازی دارو توسط آنزیم ها می باشد. در این میان شایع ترین مکانیسم مقاومت در سویه های استافیلوکوک اورئوس غیرفعال سازی دارو توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینو گلیکوزیدها (AMEs) می باشد (1). در سویه های استافیلوکوک اورئوس سه ژن کد کننده این آنزیم ها $\text{aac}(6')\text{-Ie-aph}(2'')$ ، $\text{aph}(3')\text{-III}$ و $\text{ant}(4')\text{-Ia}$ از اهمیت ویژه ای در قیاس با دیگر ژن های کد کننده AMEs برخوردارند (5).

با توجه به گسترش سویه های MRSA در هر دو محیط بیمارستان و جامعه و اهمیت آمینو گلیکوزیدها در درمان عفونت های ناشی از این ایزوله ها، هدف اصلی این پژوهش بررسی فنوتیپی مقاومت به آمینو گلیکوزیدها و تعیین فراوانی ژن های $\text{aac}(6')\text{-Ie-aph}(2'')$ ، $\text{aph}(3')\text{-III}$ ، $\text{ant}(4')\text{-Ia}$ ، $\text{aph}(2'')\text{-Ib}$ ، $\text{aph}(2'')\text{-Ic}$ و Id دخیل در ایجاد مقاومت به آمینو گلیکوزیدها در میان ایزوله های MRSA می باشند.

یافته ها و بحث

از مجموع 130 ایزوله استافیلوکوک اورئوس جمع آوری شده از نمونه های مختلف بالینی تعداد 57 ایزوله MRSA شناسایی شدند. شیوع ایزوله های MRSA در هر دو محیط بیمارستان و جامعه در حال افزایش است. در این مطالعه شیوع این ایزوله ها در شهر کرمان 41 درصد بود، این در حالی است که در مطالعات پیشین شیوع ایزوله های MRSA در نقاط مختلف ایران را از 19 تا 90 درصد گزارش کرده اند (1). رحیمی در سال 2015 و ایمان عینی و همکاران در سال 2013 شیوع ایزوله های MRSA را در تهران به ترتیب 29/9 و 63/6 درصد گزارش کردند (7، 1). از عوامل اصلی تفاوت در فراوانی این ایزوله ها می توان به تعداد بیماران مورد مطالعه و مکان جغرافیایی بیمارستان های مورد بررسی اشاره کرد (11).

در مطالعه حاضر بیشترین مقاومت نسبت به تتراسیکلین (90 درصد) و اریترومایسین (88 درصد) وجود داشت. هم چنین 70/2 درصد از ایزوله ها به سیپروفلوکساسین، 62/2 درصد به کلیندامایسین و 49/1 درصد به تری متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بودند. در مطالعه ما مقاومت بالا نسبت به تتراسیکلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مشابه با سایر مطالعات بود (12، 1). یکی از علل این مقاومت بالا می تواند ناشی از استفاده زیاد از این آنتی بیوتیک ها در ایران باشد (11). در مقابل تمامی ایزوله ها به ونکومایسین حساس بوده و تنها 2 درصد به لینزولید مقاوم بودند. نتایج این مطالعه نشان می دهد حتی با استفاده زیاد از ونکومایسین هنوز مقاومتی نسبت به آن ایجاد نشده است و این آنتی بیوتیک هم چنان می تواند به خوبی علیه عفونت های استافیلوکوک اورئوس مورد استفاده قرار گیرد. این نتیجه مشابه با نتایج به دست آمده در مطالعات قبلی می باشد (11، 1). در این مطالعه 49 ایزوله MRSA حداقل به یکی از آنتی بیوتیک های آمینو گلیکوزید مقاوم بودند.

میزان مقاومت بالایی به کانامایسین (73/3 درصد)، جنتامایسین (68/4 درصد)، توبرامایسین (59/6 درصد) و آمیکاسین (54/4 درصد) مشاهده گردید. تنها 19/3 درصد ایزوله ها به نتیل مایسین مقاوم بودند. این نتایج نقش مؤثر جنتامایسین در درمان ترکیبی عفونت های استافیلوکوک اورئوس را کمرنگ می کند. با این حال نتیل مایسین می تواند جایگزین مناسبی برای جنتامایسین در درمان عفونت های ایجاد شده توسط ایزوله های MRSA باشد.

نتایج مربوط به فراوانی ژن های کد کننده AME در ایزوله های MRSA نشان داد از 49 ایزوله مقاوم به آمینو گلیکوزیدها 29 ایزوله حداقل دارای یکی از ژن های کد کننده AME بودند. شایع ترین ژن کد کننده مقاومت به آمینو گلیکوزیدها در بین این 29 ایزوله ژن *aac(6)-Ie-aph(2)* بود که 23 ایزوله (79/3 درصد) دارای این ژن بودند و به دنبال آن ژن های *aph(3)-III* و *ant(4)-Ia* با 9 (31 درصد) و 7 (24/1 درصد) قرار داشتند. ژن *aph(2)-Id* نیز در 2 (6/9 درصد) ایزوله مشاهده شد. هیچ کدام از ایزوله ها دارای ژن های *aac(6)-Ib* و *aph(2)-Ic* نبودند. 7 ایزوله ژن *aac(6)-I* و *aac(6)-Ie-aph(2)-IIIa*، 3 ایزوله *aac(6)-Ie-aph(2)-I* و *ant(4)-Ia* و 2 ایزوله ژن *aac(6)-Ie-aph(2)-I* و *aph(2)-Id* را به طور همزمان دارا بودند.

در تعداد دیگری از مطالعات نیز ژن *aac(6)-Ie-aph(2)-I* بیشترین فراوانی را در میان ایزوله های MRSA دارا بود (13، 14). همانند دیگر مطالعات این ژن عمده تاً در میان ایزوله های مقاوم به جنتامایسین و آمیکاسین مشاهده گردید و احتمالاً موجب مقاومت به این آنتی بیوتیک ها می شود (7، 1). این موضوع وقتی قوت بیش تری می گیرد که مشابه با دیگر مطالعات در ایزوله های حساس به جنتامایسین و آمیکاسین ولی مقاوم به دیگر آمینو گلیکوزیدها، ژن های دیگر AME موجب

به تشخیص نیستند و یا ممکن است ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید جدیدی وجود داشته باشد که در جمعیت های استافیلوکوک اورئوس در حال گردش هستند (14).

در پایان می توان گفت به دلیل مقاومت بالا به آمینوگلیکوزیدها و همچنین فراوانی بالای ژن های AMEs در میان ایزوله های MRSA، اتخاذ راهکارهایی برای جلوگیری از پخش این ایزوله ها در محیط بیمارستان و انتخاب مناسب آنتی بیوتیک توسط پزشک معالج ضروری به نظر می رسد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی و اجرایی اعلام می دارند.

مقاومت می شوند (14). با این وجود ایزوله های حساس به جنتامایسین و آمیکاسین هم وجود داشتند که ژن $I-aac(6')-Ie-aph(2'')$ را داشتند که با مطالعه پیشین در تهران مشابه است اما با دیگر مطالعات در تضاد می باشد (1، 13). مطالعات قبلی نشان داده اند که در ایزوله های استافیلوکوک اورئوس ژن $ant(4')-Ia$ موجب مقاومت به کانامایسین و توبرامایسین می شود (14). در مطالعه حاضر نیز تقریباً تمامی ایزوله هایی که دارای ژن $ant(4')-Ia$ بودند به کانامایسین و توبرامایسین مقاوم بودند.

تعداد 20 ایزوله از لحاظ فنوتیپی حداقل به یکی از آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید مقاومت داشتند اما در این ایزوله ها هیچ یک از ژن های کد کننده AME مشاهده نشد. عدم شناسایی این ژن ها را می توان این طور تفسیر کرد که واریانت های متفاوتی از این ژن ها حضور دارند که با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه قادر

References

1. Rahimi F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant staphylococcus aureus strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(1): 2-7.
2. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect. 2001; 3(7): 585-594.
3. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(3): 430-450.
4. 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. J Urmia Univ Med Sci. 2014; 24(11): 883- 893.
5. Oyebode ATA, David OO, Kunle PB, Aderayo AA, Adeolu O. Distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes amongst methicillin resistant and methicillin sensitive Staphylococcus aureus isolates from Nigerian hospitals. Afr J Microbiol Res. 2015; 9(5): 318-325.

6. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010; 9(1): 23.
7. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazar Khoshgnab B, 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.
8. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(7): 1654–1660.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved standard. M2-A9. 9th ed. Wayne, Pennsylvania. CLSI, NCCLS. 2006.
10. Vakulenko SB, Donabedian SM, Anatoliy M, Zervos MJ, Lerner S a, Chow JW, et al. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(4): 1423–1426.
11. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital- and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *J Med Microbiol*. 2014; 63(6): 796–804.
12. Mohammadi S, Sekawi Z, Monjezi A, Maleki MH, 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.
13. Emaneini M, Taherikalani M, Eslampour MA, 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.
14. 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.