بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA) و تعیین ژن مقاومت به آمینو گلیکوزید(2″)-Ie/aph(6′)-aac جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های امام حسین، لقمان حکیم و پارس تهران به روش PCR

مینا کاوسی[1]، فهیمه نعمتی منصور[2*]، سیدمحسن مهدیون[3]

۱) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲) گروه بیوتکنولوژی. دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳) گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

چکیده

مقدمه: استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم ترین عوامل عفونت های منشاء گرفته از جامعه و منشاء گرفته از بیمارستان را پدید می آورد. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتری کش قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام ها 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 که موجب مقاومت به متی سیلین می شود، به روش دیسک دیفیوژن و PCR در ایزوله های بالینی MRSA است.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۷۴ ایزوله MRSA جدا شده از نمونه های مختلف بالینی نظیر خون، خلط، اگزدای تراشه، برونش، پلور، ادرار، زخم و کتتر، برای تعیین مقاومت دارویی آنتی بیوتیک های اریترومایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، سفازولین، ریفامپین، داکسی سیکلین، کوتریموکسازول و ونکومایسین با روش انتشار دیسک کربی-باثر با توجه به رهنمون های CLSI مورد بررسی قرار گرفتند. وجود استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین با گزاشتن دیسک های آنتی بیوتیکی اگزاسیلین و سفوکسیتین بررسی و تایید شد. سپس DNA ایزوله های MRSA برای یافتن ژن های mecA و ژن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها aac(6′)-Ie/aph(2″) توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج آنتی بیوگرام نشان داد تمامی سویه ها به اگزاسیلین و سفوکسیتین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین مقدار مقاومت به اریترومایسین با ۸۴/۸ درصد مشاهده شد. هم چنین تمام ایزوله ها به ونکومایسین حساس بودند. با انجام PCR ۱۰۰ درصد سویه ها از نظر ژن mecA و ۷۸/۳ درصد سویه ها از نظر حضور ژن aac(6′)-Ie/aph(2″) مثبت بودند.

بحث و نتیجه گیری: بررسی ها نشان داد که در ایزوله MRSA درصد شیوع ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها بسیار زیاد می باشند.

واژه های کلیدی: ژن mecA، آنزیم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین

* نویسنده مسئول: گروه بیو تکنولوژی. دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
Email: f_nemati82@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم ترین عوامل عفونت های منشاء گرفته از جامعه و منشاء گرفته از بیمارستان را پدید می آورد(۱). این باکتری می تواند منجر به بروز عفونت های مختلفی در بیماران شود. از جمله آن ها می توان به: سپتیسمی، پنومونی، عفونت زخم، اندوکاردیت، عفونت های وابسته به کتتر و عفونت مجرای ادراری(UTI) اشاره نمود(۲).

مقاومت به متیسیلین در ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ یعنی تنها چند سال پس از شروع تجویز متی سیلین در انگلستان مشاهده شد، و هم اکنون به عنوان یک عامل عفونت بیمارستانی رایج مطرح می باشد(۳). از آن زمان فراوانی ایزوله های مقاوم به متیسیلین دائماً افزایش یافت، به طوری که عفونت های بیمارستانی گسترده ای در نقاط مختلف دنیا در دهه ۱۹۷۰ گزارش شد(۴).

سویه MRSA از استافیلوکوک اورئوس می باشد که به یک گروه بزرگ آنتی بیوتیک ها به نام بتالاکتام ها مقاوم است، که شامل پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها می باشند. مقاومت به متی سیلین نشان دهنده مقاومت به تمامی پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلین از و سفالوسپورین ها می باشد(۳). تقریباً به تمام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یک پروتئین متصل به پنی سیلین اضافه شده است. که PBP2a نامیده می شود. نسبت PBP2a به PBP2 میل ترکیبی بسیار کمتری به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی دارد، که هدف اصلی فیزیولوژیکی متی سیلین می باشد. PBP2a توسط ژن mecA کد گذاری می شود(۵).

با گذشت زمان، همراه با گسترش بیشتر ایزوله های MRSA، این باکتری ها به مرور نسبت به برخی از آنتی بیوتیک های دیگر مثل تتراسایکلین ها، آمینوگلیکوزیدها، لینکوزامیدها و سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم شده و درمان عفونت ها را مشکل تر از گذشته کرده اند(۴،۶). آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی یکی از عوامل مهم آنتی باکتریال می باشند که برای درمان بسیاری از عفونت های باکتریایی به خصوص عفونت های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می گیرند(۷) آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام ها و گلیکوپپتیدها در درمان عفونت هایی مانند اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک ها و استافیلوکوک ها ایجاد می شود کاربرد دارند(۸).

آمینوگلیکوزیدها، این مولکول های کاتیونی، با اتصال به زیر واحد s۳۰ ریبوزومی سبب قطع ترجمه باکتری شده و اثرات آنتی باکتریال خود را اعمال می کنند(۹). سه مکانیسم مقاومت به آمینو گلیکوزیدها شامل: تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعالسازی آنزیمی دارو می باشد. در این میان غیرفعالسازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغییردهنده آمینو گلیکوزیدها اصلی ترین مکانیسم مقاومت در گونه های استافیلوکوکی است. این آنزیم ها بر اساس فعالیت تغییردهندگی شان به سه رده مختلف طبقه بندی می شوند و شامل: آمینوگلیکوزیداستیل ترانسفرازها، آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها هستند. سه آنزیم APH(3′)-III ،AAC(6′)/APH(2″) و ANT(4′)که به ترتیب توسط ژن های aac(6')-aph(3′)-IIIa،Ie/aph(2") و ant(4′)-Ia رمز می شوند جزء شایع ترین آنزیم های تغییردهنده در گونه های مختلف استافیلوکوک ها هستند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند(۱۰).

در نتیجه با توجه به اهمیت بیماری زایی، شیوع بالای مقاومت به متی سیلین، حضور مداوم، گسترش سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین، بالا بودن مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در این سویه ها و با تاکید بر نقش آمینوگلیکوزیدها در درمان ترکیبی عفونت های استافیلوکوکی مطالعه دوره ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم ضرورت دارد. هدف این تحقیق بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA) و تعیین ژن مقاومت به آمینوگلیکوزید aac(6′)-Ie/aph(2″) جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های امام حسین، لقمان حکیم و پارس تهران به روش PCR می باشد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

مواد و روش ها

جمع آوری و تشخیص باکتری ها: در یک مطالعه مقطعی ۱۷۴ سویه بالینی استافیلوکوک و ساورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه های بالینی مختلف نظیر زخم، خون، خلط، تراشه، برونش، پلور، کتتر و ادرار از سه بیمارستان امام حسین، لقمان و پارس در تهران طی سال های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ به روش تصادفی جمع آوری شد. تمامی سویه ها ابتدا روی محیط مانیتول نمک آگار تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کشت داده شدند و سپس برای تعیین هویت سویه ها از رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کوآگولاز و DNase برای تشخیص استافیلوکوک و ساورئوس استفاده شد(۱۱).

در نهایت از تمامی سویه ها در محیط تریپتیک سوی براث تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حاوی ۱۵ درصد گلیسرولاستوک کشت ذخیره تهیه و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تعیین استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA): برای تعیین استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین ابتدا از روش انتشار دیسک بر روی آگار استفاده شد. جهت تشخیص فنوتیپی ایزوله های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین از دیسک ۱ میلی گرم اگزاسیلین(OX) و ۳۰ میلی گرم سفوکسیتین(FOX) بر روی محیط مولر هینتون آگار دارای ۴ درصد NaCl طبق توصیه(CLSI 2011) استفاده گردید. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اگزاسیلین کمتر از ۲۱ میلی متر و نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۱۳ میلی متر بود نمونه استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین در نظر گرفته شد(۵،۱۲).

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها: برای تعیین الگوی مقاومتی سویه ها، حساسیت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک های ریفامپین (Rifampin (5 µg، تری متوپریم+سولفامتوکسازوت (trimethoprim+Sulfamethoxazote) (30 µg)، جنتامایسین(Gentamycin (15 µg، اریترومایسین(Erythromycin (15 µg، سیپروفلوکسازین (Ciprofloxacin (5 µg، کلیندامایسین(Clindamycin(2 µg، سفازولین (Cephazolin(30 µg، دوکسی سیکلین (doxycycline(30 µg و سفوکسیتین (Cefoxitin(30 µg مطابق روش انتشار از دیسک کربی-بائر با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک (Mast, UK) و برای تعیین حساسیت به ونکومایسین از روش E-test با رعایت استانداردهای CLSI بررسی شد(۵،۱۲).

برای کنترل کیفی دیسک ها و پودرهای آنتی بیوتیک از سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 استفاده شد. هم چنین 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).

استخراج ژنوم: برای استخراج DNA از سویه های استافیلوکوک اورئوس از کیت های استخراج DNA (QiaAmp DNA Mini Kit Cat.No: 51304) شرکت کیاژن آلمان استفاده شد. مقداری از کلنی ایزوله ها به محیط کشت LB براث(Merck, Germany, Cat Number: 11285) تلقیح و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۲۴ درجه سانتی گراد و پس از آنسانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ انجام گرفت. طبق پروتکل کیت بر روی رسوب حاصله ۲۰۰µL از بافر لیز کننده(برای تخلیص بهتر و بیشتر DNA از آنزیم لیزواستافین (Sigma, St Louis, USA) نیز استفاده شد) اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد.

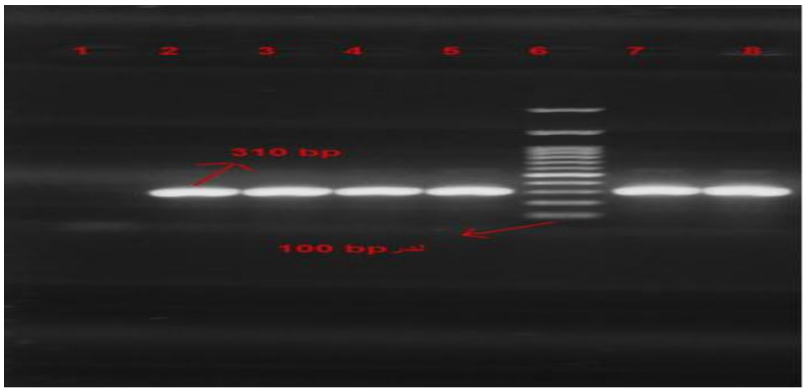
سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول های ذکر شده در پروتکل الصاقی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس با افزودن اتانول مطلق سرد و سانتریفوژ آن و اضافه نمودن اتانول ۷۰ درصد و بیرون ریختن مواد رویی DNA استخراج شده رسوب کرد. سپس بافر حل کننده به رسوب DNA اضافه و در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد(تمام مراحل در پروتکل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

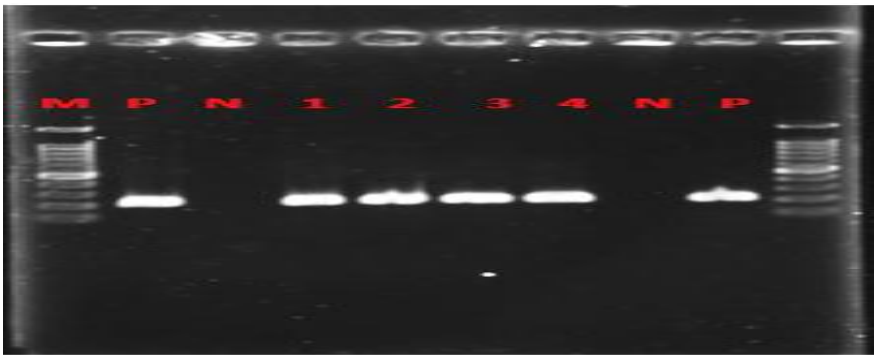
الصاقی درون کیت به طور کامل توضیح داده شده است).

تایید ژنتیکی ایزوله ها: برای تایید استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین، بررسی تمام ایزله ها از نظر وجود ژن mecA و با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی (سنتز پرایمر توسط ژن فن آوران ایران) به روش PCR انجام شد(۵). 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)(شکل شماره ۱).



شکل 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 ۱۰۰bp

واکنش PCR برای ۱۷۴ ایزوله MRSA صورت گرفت و برای اطمینان از درست بودن کار در آزمایش های PCR و الکتروفورز از نمونه استاندارد ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت برای ژن های مقاومت آمینوکلیکوزیدی استفاده گردید(۱۵)(شکل شماره ۲).



شکل 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 bpP ۱۰۰: کنترل مثبت ATCC43300N: کنترل منفی ردیف ۱ تا ۴: نمونه بالینی

برای تکثیر ژن (″aac(6′)-Ie/aph(2 از یک جفت پرایمر اختصاصی(سنتز پرایمر توسط ژن فن آوران ایران) که در سال ۱۹۹۴ توسط Vanhoof و همکاران به کار برده شد و توالی آن در جدول شماره ۱ آورده شده استفاده گردید.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

جدول شماره ۱. توالی آغازگر های مورد استفاده به همراه اندازه محصولات قطعات PCR

Gene	Perimer Sequencimg	سایز	منابع
mecA	5'GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA3' 5'CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA3'	۳۱۰	(۵)
aac(6´)-Ie/aph(2˝)	5´CCAAGAGCAATAAGGGCATACC3´ 5´CACACTATCATAACCACTACCG3´	۲۲۲	(۱۶)

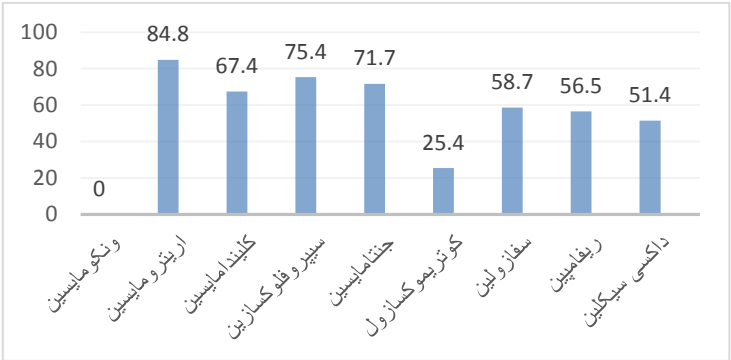
مخلوط نهایی واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱ میکرومول از هر جفت آغازگر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس Amplicon، ۳ میکرولیتر DNA الگو که با ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس ویال ها در دستگاه ترموسایکلر(PioIntellectica Canada) قرار گرفت. برنامه دستگاه ترموسایکلر در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲. مراحل واکنش PCR برای شناسایی ژن های مقاومت آمینوگلیکوزیدی و mecA

فاکتور	دما(ºC)		زمان	
ژن / مرحله	mecA	aac(6´)-Ie/aph(2˝)	mecA	aac(6´)-Ie/aph(2˝)
واسرشتگی اولیه	94°C	94°C	5 min	5 min
واسرشتگی	94°C	94°C	1min	1min
اتصال	57°C	45°C	1 min	1 min
تکثیر	72°C	72°C	30 s	30 s
تکثیر نهایی	72°C	72°C	8 min	8 min
تعداد سیکل	۳۵	۳۵		

یافته های پژوهش

در این بررسی که از تیر ۱۳۹۵ تا فروردین ماه سال ۱۳۹۶ انجام شد، ۱۷۴ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین از نمونه های مختلف بالینی نظیر: خون(۳/۱ درصد)، خلط(۶/۲ درصد)، اگزدای تراشه (۳۱/۹ درصد)، برونش(۱۵/۵ درصد)، پلور(۷/۷ درصد)، کتتر(۸ درصد) ادرار(۱۲ درصد) و زخم(۱۸/۲ درصد) جدا شده از بیمارستان های امام حسین(۲۰/۷ درصد)، لقمان حکیم(۵۰/۵ درصد) و پارس(۲۸/۸ درصد) تهران مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آنتی بیوگرام به روش انتشار از دیسک کربی–بائر بالاترین میزان مقاومت را در برابر اریترومایسین(۸۴/۸ درصد) نشان داد(نمودار شماره ۱). و نیز با انجام روش E-test تمام سویه ها به ونکومایسین حساس شناخته شدند. هم چنین میزان مقاومت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی ۷۱/۷ درصد مشاهده شد. در این مطالعه میزان مقاومت چند دارویی نیز بالا بود(جدول شماره ۳).



نمودار شماره ۱. درصد مقاومت ایزوله های استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین در برابر آنتی بیوتیک های مورد آزمایش

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

جدول شماره ۳. میزان مقاومت چند گانه دارویی در ایزوله های جدا شده از بیمارستان های مختلف

مقاومت چندگانه دارویی	درصدکل مقاومت چند گانه	لقمان	پارس	امام حسین
۳ کلاس آنتی بیوتیکی	n=۹	n=۵	n=۲	n=۲
	۵/۱ درصد	۵۵/۵ درصد	۲۲/۲ درصد	۲۲/۲ درصد
۴ کلاس آنتی بیوتیکی	n=۸	n=۴	n=۱	n=۳
	۴/۵ درصد	۵۰ درصد	۱۲/۵ درصد	۳۷/۵ درصد
۵ کلاس آنتی بیوتیکی	n=۱۹	n=۷	n=۷	n=۵
	۱۰/۹ درصد	۳۶/۸ درصد	۳۶/۸ درصد	۲۶/۳ درصد
۶ کلاس آنتی بیوتیکی	n=۴۷	n=۲۰	n=۱۶	n=۱۱
	۲۷ درصد	۴۲/۵ درصد	۳۴ درصد	۲۳/۴ درصد
۷ کلاس آنتی بیوتیکی	n=۶۶	n=۲۷	n=۲۴	n=۱۵
	۳۷/۹ درصد	۴۱ درصد	۳۶/۳ درصد	۲۲/۷ درصد

در این مطالعه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR، ۱۷۴ ایزوله برای وجود ژن های mecA و aac(6′)-Ie/aph(2″) مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی ایزوله ها دارای ژن mecA و ۱۳۴ (۷۷ درصد) سویه ها دارای ژن aac(6′)-Ie/aph(2″) بودند(نمودار شماره ۲).

بحث و نتیجه گیری

عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲ مقاله ای منتشر کردند که در آن شیوع استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین را در کل مقالات منتشر شده در ایران بررسی نمودند. بر طبق یافته های 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 یافت گردید(۱۷). در مطالعه ایمان عینی و همکاران که در سال ۲۰۱۳ بر روی ۱۵۱ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران سوختگی در تهران انجام شد تعداد ۹۶ (۶۳/۶ درصد) از ایزوله ها دارای ژن mecA تشخیص داده شدند(۱۸). بنا بر این با توجه به اهمیت بیماری زایی و بالا رفتن شیوع مقاومت به متی سیلین در سال های اخیر، مطالعه دوره ای برای شناسایی و جلوگیری از انتشار سویه های مقاوم ضرورت دارد و ما در مطالعه حاضر سعی نمودیم که به طور اختصاصی بر روی سویه های مقاوم به متی سیلین تحقیق نماییم.

در مطالعه ما نشان داده شد سه نمونه از ایزوله ها که در روش دیسک دیفوژن اگزاسیلین و سفوکسیتین حساسیت نشان دادند دارای ژن mecA بودند. علت این است که ژن mecA به طور دائم بیان نمی شود و ژن های جانبی ویژه ایی هم چون ژن femA و mecR ممکن است در بیان آن نقش داشته باشد. یا این که در برخی موارد استافیلوکوک ها نسبت به متی سیلین و اگزاسیلین به صورت هتروژن مقاومت نشان می دهد و در این حالت در آزمایش های تعیین حساسیت گاهی به صورت حساس ظاهر می شوند چرا که ژن mecA به صورت دائم بیان نمی شود در حالی که سویه ها ذاتاً دارای این ژن مقاومت هستند(۱۹). به همین دلیل است که از روش PCR به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص سویه MRSA نام برده می شود(۲۰). در چنین مواردی مقاومت به تولید بیش از حد آنزیم بتالاکتاماز یا وجود PBP دیگری به غیر از PBP2a یا PBP2’ که توسط ژنی غیر از ژن mecA کد می شوند، نسبت داده می شود(۱۹). در مطالعه ما تمام سویه ها پس از انجام PCR دارای ژن mecA بودند. در مطالعات متعددی ارتباط بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و مقاومت به متی سیلین را نشان داده اند(۱۳،۲۱،۲۲). در کشورهای مختلف مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های استافیلوکوک اورئوس رایج است و به خصوص مقاومت به جنتامایسین دارای اهمیت کلینیکی بالایی می باشد. همچنین حساسیت ایزوله های استافیلوکوک اورئوس نسبت به جنتامایسین به عنوان شاخص مقاومت آمینوگلیکوزیدی می باشند(۲۳). گونه هایی که ژن aac(6’)-Ia/aph(2’) را نگهداری می کردند کدکننده آنزیم AAC(6’)-APH(2’) و حتی همه آنزیم های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها به خاطر مقاومت به جنتامایسین مورد توجه قرار گرفتند(۱۶،۲۳،۲۴). در مطالعه وانهوف و همکاران که در دو دوره زمانی ۱۹۸۰ و ۱۹۹۱ بر روی استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به متی سیلین انجام گرفت میزان مقاومت به جنتامایسین به طور میانگین ۸۸ درصد گزارش شد(۱۶). عباس یادگار و همکاران در سال ۲۰۱۰ با جمع آوری ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین از بیمارستان های بقیه الله و شریعتی تهران میزان مقاومت به جنتامایسین را ۵۲ درصد گزارش نمودند(۱۳). در مطالعه دیگری که توسط آقای مرغکی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ۵۷ ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های کلینیکی در شهر کرمان انجام گرفت ۶۸/۴ درصد به جنتامایسین مقاومت نشان دادند(۲۷). در این مطالعه با روش دیسک دیفیوژن مقاومت به جنتامایسین ۷۱/۷ درصد برآورد شد.

نتایج مطالعات مختلف در سایر کشورها نشان داد که ژن aac(6')/aph(2') فراوان ترین ژن کدکننده آنزیم های AME در ایزوله های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است(۱۶). هم چنین طی مطالعه ای که توسط چوی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره جنوبی انجام شد نتایج مشابهی به دست آمد بدین صورت که ژن aac(6')/aph(2') با فراوانی ۶۵ درصد شایع ترین ژن در میان ایزوله های مورد مطالعه بود و بعد از آن ژن های aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia به ترتیب با فراوانی ۴۱ درصد و ۹ درصد شناسایی شدند(۲۱). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Nurittin و همکاران صورت گرفت درصد حضور ژن aac(6')/Aph(2") در ۶۶ درصد استافیلوکوک ارئوس های مقاوم به متی سیلین مشاهده شد به دنبال آن ژن Ant(4)-Ia و Aph(IIIa) به ترتیب با ۲۴ درصد و ۸ درصد مشاهده شد(۲۵). که مشابه نتیجه به دست آمده در مطالعه چویی بود. و در مقابل طی تحقیقی که Ida و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر 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 درصد و Aph(IIIa) ۸/۹ درصد بود(۲۶). مطالعه ای که عباس یادگار و همکاران در سال ۱۳۸۸ بر روی ۱۰۰ ایزوله به دست آمده در بیمارستان شریعتی و بقیه الله تهران داشتند ۵۸ درصد سویه ها 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 آن چه ارائه شد به دست آمد به طوری که میزان مقاومت به ژن aac(6′)/aph(2″)-Ia با استفاده از ردیابی ژن توسط روش PCR ۷۸/۳ درصد بود. پس می توان نتیجه گیری کرد ژن های مختلف ایجادکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی می توانند در کلون های مختلف MRSA در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت باشند(۲۶). و شاید بتوان نتیجه گرفت که ژن aac(6')/aph(2') میزان مقاومت آمینوگلیکوزیدی بیشتری را کد می کند. هم چنین در مناطق جغرافیایی مثل ایران در استان های مختلف ژن های متفاوتی ممکن است علت بروز این مقاومت باشند و می تواند بیانگر این مسئله باشد که مصرف آنتی بیوتیک های مختلف از خانواده آمینوگلیکوزید و هم چنین مدت زمان استفاده در بیماران مختلف شاید به نوعی در بیان مقاومت موثر باشد.

افزایش چشمگیری در شیوع استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و پیشرفت مقاومت چندگانه به آمینوگلیکوزیدها و دیگر آنتی بیوتیک ها در این سویه ها در سطح جهان مشاهده شده است. در این مطالعه اهمیت واژه مقاومت به آمینوگلیکوزیدازها و ظهور مقاومت به متی سیلین نشان داده شده و اما سرعت و شیوع پیشرفت مقاومت، وابسته به نحوه مصرف آنتی بیوتیک در بیمارستان های مناطق مختلف است. در نتیجه سرعت تشخیص عفونت وابسته به MRSA و دیگر ایزوله های مشکل ساز بیمارستانی و تشخیص و درمان صحیح و به موقع مهم ترین امر در اپیدمیولوژی هستند. بنا بر این زمانی که درمان عفونت MRSA در بیمارستان هایی که امکان انجام مطالعات مولکولی در آن وجود ندارد در حال برنامه ریزی می باشد نباید نرخ بالای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را نادیده گرفت.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

کد پایان نامه و اخلاق: (۲۲۵۳۰۵۰۷۹۳۲۰۲۰)

References

1. Alkhulaifi M, Amin A, Ali A. 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 Sci2009; 16:37-49.doi: 10.1016/j.sjbs.2009.07.006

2. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, Mctavish S, et al. Combinations of β-lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin sensitive and methicillin resistant Staphylococcus aureus. PLos One 2015; 10:117664.doi: 10.1371/journal.pone.0117664.

3. Manju M, Ragunathan L, Gautam S. Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction and conventional methods. J Lab Phys2012; 4:83-88. doi: 10.4103/0974-2727.105587

4. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Palk YH, et al. Phenotypic and genotypic antibiogram of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Korea. J Dairy Sci 2007; 90:1176-85.

5. Mostafa S. Molecular typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus by spa gene polymorphism. AJMR 2013 26; 7:755-9. doi: 10.5897/AJMR12.1430

6. Yinduo JI. Methicillin resistant Staphylococcus aureus protocols. Meth Mol Biol 2007; 391:7.

7. Neeta G, Mohiuddin Q. Rrcent trend of aminoglycoside resistance among Staphylococcus aureus isolate in tertiary care hospital. JMA2014; 6:94-6. doi: 10.5897/JMA2014.0315.

8. Edson R, Terrell C. The aminoglycosides. Mayo Clin Proc1991;66:1158-64.doi: 10.1016/S0025-6196(12)65798-X.

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. J Antimicrob Chemother1999; 43:253-9. doi:10.1093/jac/43.2.253.

10. Oyebode 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. AJMR 2015; 9:318-25. doi: 10.5897/AJMR2014.7300.

11.Hadadi A, Moraditabriz H, Mehdipour B, Moslehi B, Esmaielzadeh P. [Determining the prevalence of methicillin- and vancomycin resistant Staphylococcus aureus by MIC and E-Test]. TUMS J 2011; 69, 344-51. 8.(Persian)

12. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty first informational supplement. CLSI 2011;31:100-21.

13. Yadegar A, Satri M, Mozafari N, GudarziGh. [Pervalence ant 4Ia gene among nosocomial methicillin resistant Staphylococcus aureus by multiplex-PCR]. J Med Sci Modares2010;12,1:59-68. (Persian)

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; 36:618-23.

15. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin resistant Staphylococci. Microbiol Res 2006;161:49-54. doi:10.1016/j.micres.2005.05.002.

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 Microbio1 1994; 282-90.doi: 10.1099/00222615-41-4-282.

17. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderinasab M. [Epidemiology of mecA methicillin resistant Staphylococcus aureus in Iran]. Iran J Bas Med Sci 2012; 15:1010-19. (Persian)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

18. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli F, Noorazarkhoshgnab B, et al. [distribution of genes encoding tetracyclinresistante and aminoglycoside modifying enzymes in Staphylococcus aureuse strains isolatedfrom a burn center]. Ann Burns Fire Dis 2013;26:76-80. (Persian)
19. Sabath LD. Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in strains of Staphylococcus aureus. Ann Int Med 1982; 97: 339-344.
20. Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. Int J Antimicrob Age 1998;10:95-105.doi: 10.1016/S0924-8579(98)00033-8.
21. 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;18:631-6. doi: 10.3346/jkms.2003.18.5.631.
22. 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;57:138-63.
23. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram positive cocci. Antimicrob Age Chemother 1990; 34:2164-8. doi: 10.1128/AAC.34.11.2164.
24. 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. doi: 10.1016/S0924-8579(99)00124-7.
25.Nurittin A, Baris S, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin resistant staphylococci. Microbiol Res 2006; 161:49-54. doi:10.1016/j.micres.2005.05.002.
26. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside modifying enzymes by susceptibility testing epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol 2001;39:3115-21.doi: 10.1128/JCM.39.9.3115-3121.2001.
27. Marghaki F, Hosseininave H, Kalantarneyestanaki D, Safaari F, Fasihi Y, Moradi M. [Frequency of aminoglycoside-resistance genes in methicillin resistnt Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens]. J Mazandaran Uni Med Sci 2017; 27: 112-17. (Persian)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]

The Prevalence of Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and the Determination of Aminoglycoside Resistance Gene aac(6′)-Ie/aph (2″) Isolated from Hospitalized Patientsin Imam Hossein, Loghman Hakim, and Pars Hospitals in Tehran using

Polymerase chain Reaction

Kavusi M[1], Nematimansour F[2], Mahdiyoun M[3]*

(Received: June 17, 2017 Accepted: February 12, 2018)

Abstract

Introduction: Staphylococcus aureus is one of the critical pathogens resulted in hospital land community-acquired infections. Aminoglycosides are potent bactericidal agents that are often used in staphylococcal infection treatment in combination with a beta-lactam or glycopeptide antibiotics. The aim of this study was to determine the frequency of encoding gene ofaac (6′)-Ie/aph (2″).This gene is one of the important aminoglycoside modifying enzymes in combination with mecA which results in methicillin resistance. In doing so, disk diffusion and polymerase chain reaction (PCR) methods were utilized in clinical isolates of methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA).

Materials & Methods: In the current study, 174 clinical isolates of MRSA were obtained from different clinical specimens, including blood, sputum, trachea, brunch, pleura, urine, wound, and catheter. Antibiotic resistance of erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, cefazolin, rifampicin, doxycycline, cotrimoxazole and vancomycin was determined using Kirby-Bauer disk diffusion test method according to the CLSI guidelines. The presence of MRSA was confirmed using oxacillin and cefoxitin anti biotic disc diffusion. Subsequently, DNA of MRSA isolates was investigated to detect mecA and aminoglycoside resistance aac (6′)-Ie/aph (2″) genes using PCR. *Ethics code:* 22530507932020

Findings: The results obtained from biogram anti-microbial susceptibility test system indicated that all of the isolates were resistant to oxacillin and cefoxitin. All of the isolates were sensitive to vancomycin and majority of them were resistant to erythromycin (84.8%). According to PCR test results, 100 and 78.3% of the isolates were positive for the mecA and aac(6′)/aph(2″)-Ia genes, respectively.

Discussion & Conclusions: According to the results, the aminoglycoside resistance geneswere highly prevalent in MRSA isolates.

Keywords: aac(6′)-Ie/aph(2″), Aminoglycoside modifying enzyme, mecA, Methicillin resistant Staphylococcus aureus

1. Dept of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran
2. Dept of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Tehran, Iran
3. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
**Corresponding author Email: f_nemati82@yahoo.com*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.85]