Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 19(116): 11-25

Original Article

The Presence of aac *(6 ') Ie / aph (2 ")*, *aph (3') - IIIa1*, *ant (4 ') - Ia1* Genes and Determining Methicillin Resistance in Staphylococcus Epidermidis and Staphylococcus Saprophyticus Strains Isolated from Clinical Specimens

Mohammad Bokaeian[1], Javad Adabi[2], Behroz Zeyni[3], Hamed Tahmasebi[2*]

1- Associate Professor, PhD of Medical Bacteriology, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Center of Infectious Diseases & Tropical of Zahedan, Zahedan, Iran
2- MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3- MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 18 Jul 2016, Accepted: 2 Nov 2016

Abstract

Background: Aminoglycosides are used as antibiotics in combination with beta-lactamas for many treatments of *staphylococcal* infections. Development of resistance in resistant strains can be done by enzymes produced by effective genes that cause the destruction of aminoglycoside antibiotics. The aim of this study was to investigate the prevalence of the *aac (6 ') Ie / aph (2 ")*, *aph (3') - IIIa1*, *ant (4 ') - Ia1* genes and *mecA* in staphylococcus strains which play an effective part in the resistance of aminoglycosides.

Materials and Methods: in this descriptive cross-sectional observation, 113 clinical samples including 68 isolate of *Staphylococcus epidermidis* and 45 isolate of *Staphylococcus saprophyticus* of 459 clinical samples were identified by biochemical and molecular tests. The antibiotic susceptibility pattern of isolates was determined using MIC method by E-test strips. Then, to determine the presence of genes responsible for resistance to aminoglycosides, gene-specific primers were used.

Results: Of 68 isolates obtained from *saprophyticus Staphylococcus* aureus, 39isolates(57.35%) were *mecA* gene. As well, 13 isolates (19.11%) have *aac (6 ') Ie / aph (2 ")* gene, 9 isolates (13.23%) have *aph (3') - IIIa1* gene and 7 isolates (7.3%) have *ant (4 ') - Ia1* gene. Of 45 isolates of *Staphylococcus saprophyticus,* 23 isolates(51.11%) have *mecA* genes, 8 isolates (17.77%) have *aac (6') Ie / aph (2 ")* gene, 4 isolates (8/8%) have *aph (3 ') - IIIa1* gene and 2 isolates (4.4%) have gene *ant (4') - Ia1* gen.

Conclusion: Statistical analysis showed that the prevalence of aminoglycoside genes is more among strains resistant to methicillin and this would suggest that methicillin-resistant strains are easy situation for the acquisition of resistance to other antibiotics.

Keywords: Aminoglycosides, Drug resistance, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*

*Corresponding author;
Address: Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
Email: h.tahmasebi87@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۱۶)، بهمن ۱۳۹۵، ۲۵-۱۱

بررسی حضور ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2")*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و تعیین مقاومت به متی سیلین در *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی

محمدبکائیان[۱]، جواد ادبی[۲]، بهروز زینی[۳]، حامدطهماسبی[۲*]

۱.دانشیار، متخصص باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

۲.دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳.دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که با آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی برای درمان بسیاری از عفونت‌های *استافیلوکوکی* کاربرد دارند. بروز مقاومت در سویه‌های مقاوم به واسطه آنزیم هایی صورت می‌گیرد که توسط ژن‌های موثری تولید می‌شوند که سبب تخریب ساختار آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌گردند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2")*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* در ایزوله‌های استافیلوکوک است که نقش موثری در مقاومت‌های آمینوگلیکوزیدی دارند.

مواد و روش‌ها: در این بررسی توصیفی-مقطعی، از مجموع ۴۵۹ نمونه بالینی، ۱۱۳ نمونه بالینی شامل ۶۸ *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و ۴۵ *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* با تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی جداسازی شد. برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از روش تعیین حداقل غلظت مهاری با نوارهای E-test استفاده شد. سپس برای تعیین حضور ژن‌های عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: از ۶۸ ایزوله به دست آمده از *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، ۳۹ ایزوله(۵۷/۳۵ درصد) دارای ژن *mecA* بودند. هم‌چنین ۱۳ایزوله(۱۹/۱۱ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۹ ایزوله(۱۳/۲۳ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۵ ایزوله(۷/۳ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند. از ۴۵ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* نیز ۲۳ ایزوله(۵۱/۱۱ درصد) دارای ژن *mecA* ، ۸ ایزوله(۱۷/۷۷ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۴ ایزوله(۸/۸ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲ ایزوله(۴/۴ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند.

نتیجه گیری: با بررسی آماری انجام شده مشخص شد که شیوع ژن‌های آمینوگلیکوزیدی در بین ایزوله‌های مقاوم به متی سیلین بیشتر می‌باشد و این امر بیان کننده این است که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین شرایط مناسبی را برای کسب مقاومت به آنتی بیوتیک‌های دیگر دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، آمینوگلیکوزید، مقاومت دارویی

***نویسنده مسئول:** ایران، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، گروه میکروب شناسی

E.mail: h.tahmasebi87@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

مقدمه

آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که به همراه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی با منشا *استافیلوکوکی* کاربرد دارند(۱). درمان این عفونت‌ها با طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک سبب بروز مقاومت و ظهور سویه‌های جدید شده است(۲). در گروه *استافیلوکوک*، *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی(CoNs) یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها در ایجاد عفونت‌های ناشی از به کارگیری کاتاترهای بیمارستانی و آلودگی ناشی از تامپون‌های بهداشتی است(۳). گسترش این باکتری‌ها در مناطق مختلف و استفاده بی رویه از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی متفاوت، خصوصا بتالاکتام‌ها، برای درمان بیماران مبتلا به این باکتری، زمینه ساز ظهور سویه‌های مقاومی شده است(۴). از این میان می‌توان به، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین یا Methicillin-(MRSE) Resistant*Staphylococcus Epidermidis* و *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی سیلین یا Methicillin-Resistant *Staphylococcus Saprophyticus* (MRSS) اشاره کرد(۳، ۵). شیوع بالای این سویه‌ها در نمونه‌های بالینی و دامی، خصوصا در مطالعات اخیر باعث اهمیت روز افزون این باکتری در سال‌های اخیر شده است(۶). این سویه‌ها امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها پیدا کرده‌اند(۷). مقاومت به متی‌سیلین در *استافیلوکوک‌ها* به دلیل تولید پروتئینی به نام PBP2a است که یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (Binding Protein: PBP-Penicillin) تغییر یافته است و تمایل کمی برای اتصال به آنتی بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام نشان می‌دهد(۸، ۹). PBP4 و PBP2A انواع دیگری از PBP هستند که به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی سیلین، به این پروتئین بیشتر پرداخته می‌شود(۱۰). تولید این پروتئین با ژن‌های *mec* موجود بر روی کروموزوم باکتری مرتبط است(۱۱). حضور ژن *mecA* منجر به بروز *استافیلوکوک‌های* مقاوم به متی سیلین می‌شود(۱۲). ژن *mecA* بر روی یک المنت ژنتیکی سیار قرار دارد که به آن کاست کروموزومی *mec* استافیلوکوکی(Staphylococcus Casset Cromosom mec) می‌گویند(۱۳). به دلیل این‌که آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان بیماری‌های وابسته به *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی مصرف می‌شوند، مقاومت به متی سیلین می‌تواند زمینه‌ساز مقاومت به آمینوگلیوزیدها را فراهم کند(۱۴، ۱۵). آمینوگلیکوزیدها با اتصال به زیر واحد s30 ریبوزومی سبب قطع مکانیسم ترجمه باکتری شده و اثرات ضدباکتریایی خود را اعمال می‌کنند(۱۶). مقاومت به آمینو گلیکوزیدها بر اساس سه مکانیسم اصلی استوار است که شامل: تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو می‌باشد(۱). غیر فعال‌سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycoside–Modifyng Enzymes: AME) از اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت در گونه‌های *استافیلوکوکی* است(۱۷). مبنای رده‌بندی این آنزیم‌ها فعالیت تغییر دهندگی آن‌ها می‌باشد که بر این اساس به سه رده مختلف طبقه بندی می‌شوند و شامل: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها، (Aminoglycoside-acetyltransferase: AACs) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferase: APHs) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferase: ANTs) هستند(۱۳، ۱۸). سه آنزیم AAC(6´)/APH(2″)، APH(3´)-III و ANT(4´)که به ترتیب توسط ژن‌های *aac(6')-Ie/aph(2'')*، *aph(3')-IIIa* و *ant(4')-Ia* رمز می‌شوند جز شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف *استافیلوکوکی* می‌باشند و از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند(۱۹). برای تعیین ایزوله‌هایی که دارای آنزیم‌های تخریب کننده آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی و آمینوگلیکوزیدی هستند، روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی وجود دارد(۲۰). روش‌های فنوتیپی گرچه از نظر صرفه اقتصادی دارای جایگاه مناسبی هستند، ولی از لحاظ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

دقت و سرعت تشخیص دارای حساسیت و ویژگی کمتری نسبت به روش‌های ژنوتیپی هستند. این رو، هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2'')*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* به روش PCR در ایزوله‌های استافیلوکوک کوگولاز منفی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت نمونه

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۶۸ نمونه *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و ۴۵ نمونه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از بیماران بستری در مراکز درمانی شهر زاهدان در طی یک سال از اردیبهشت ۹۳ تا خرداد سال ۹۴ جمع‌آوری شدند. چیدمان متغیرهای مورد مطالعه بر اساس انواع کیفی و کمی صورت پذیرفت. هم‌چنین جهت معیار بندی ورود و خروج افراد جهت نمونه‌گیری، بیمارانی مد نظر قرار گرفتند که به مدت طولانی در بیمارستان بستری و مشکوک به عفونت باکتریای بودند. نمونه‌های کشت داده شده که از بیماران دارای عفونت‌های خون، زخم، آلودگی با سوند و کاتاتر و عفونت‌های ادراری گرفته شده بود در ابتدا در بخش میکروب شناسی بیمارستان در محیط‌های مختلف کشت داده شد و همه کلنی‌های به دست آمده توسط محیط ترانسپورت BHI(Merck آلمان) به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انتقال پیدا کردند و تا کشت اولیه اولیه درون فریزر ۲۰- تگهداری شدند. نمونه‌ها را بر روی محیط بلادآگار(Merck آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند کشت داده و کوکسی‌های گرم مثبت توسط رنگ آمیزی گرم جداسازی شد. کلنی به دست آمده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی اولیه مانند کوگولاز، کاتالاز، Mannitol Salt agar(Sigma-Aldrich آمریکا)، DNAs(Merck آلمان)، غربال‌گری شده و نمونه‌های *استافیلوکوک اورئوس* و *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *اپیدرمیدیس* از یکدیگر جداسازی شدند. کلنی‌های تایید شده برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*

برای تفکیک *استافیلوکوک*‌های کوگولاز مثبت از *استافیلوکوک*‌های کوگولاز منفی از تست کوگولاز لوله‌ای استفاده شد. برای شناسایی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* علاوه بر استفاده از دیسک‌های نووبیوسین ۳۰ میکروگرم(MAST انگلستان) و نالدیکسیک اسید ۳۰ میکروگرم(MAST انگلیس)، از تست‌های PYR(Key Diagnostics Pty استرالیا)، آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین، تولید اسید از قندهای مالتوز، ترهالوز، مانیتول و سوکروز و عدم تخمیر گلوکوز در شرایط بی هوازی، برای جداسازی این دو گونه از یکدیگر انجام گرفت. در روش دیسک انتشاری ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگار(Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک را با یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. طبق آخرین نسخه Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI) ، با استفاده از دیسک‌های نووبیوسین ۳۰ میکروگرم، باسیتراسین ۱۰میکروگرم و پلی میکسین B ۱۰۰ واحدی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* را از *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* جدا می‌کنیم. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک نووبیوسین بیشتر از ۱۶ میلی‌متر، نسبت به پلی‌میکسین B بیشتر از ۱۰ میلی‌متر و نسبت به باسیتراسین بیشتر از ۹ میلی‌متر باشد، به عنوان *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* در نظر گرفته شدند و در صورتی که قطر هاله نسبت آنتی بیوتیک‌های فوق کمتر از این مقدار باشد، به عنوان *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* در نظر گرفته می‌شود(۲۱، ۲۲). برای *استافیلوکوک هومینیس* از *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* هم از آنتی بیوتیک‌های فسفومایسین و دیسفریوکسامین استفاده شد و نمونه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک فسومایسن دارای قطر هالیه بیشتر از ۳۰میلی‌متر و برای سفریوکسامین دارای قطر هاله بیشتر از ۲۰ میلی‌متر بودند، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* در نظر گرفته شدند. در این روند شناسایی از سویه *استافیلوکوک اورئوس* ATCC33591 به عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت و از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده شد(۲۳، ۲۴).

تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و آمینوگلیکوزید با MIC E-test

مقاومت به متی سیلین به واسطه تعیین حداقل مهاری(MIC) با استفاده از نوارهای E-test اوگزاسیلین(liofilchem ایتالیا) تعیین شد. برای این کار ابتدا کلنی‌های جداسازی شده از باکتری‌های به دست آمده را به صورت چمنی بر روی محیط‌های MHA(Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد.سپس نوارها را با استفاده از یک پنس استریل کنار شعله بر روی محیط‌ها قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شد. برای تعیین مقاوم آمینوگلیکوزیدی هم از نوارهای E-test جنتامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین و کانامایسین مطابق با روش بالا استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از *استافیلوکوک اورئوس* ATCC29213 به عنوان کنترل منفی و *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ATCC12228 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۲۳).

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ژنومیک مراحل زیر را انجام شد. ایزوله‌های بالینی ذخیره شده در ۲۰-درجه سانتی‌گراد روی محیط بلاد آگارساب کالچر داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث که قبلا درون لوله‌های درب‌دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماری‌گذاری شده بودند، تلقیح شد و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر(۲۰ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شد. ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته شد و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن ایران و طبق پروتوکل شرکت سازنده انجام شد. برای تایید کار و کیفیت سنجی DNAهای استخراج شده، ابتدا با رقت‌سازی DNAهای استخراج شده، OD آن‌ها مورد خوانش قرار گرفت و هم‌چنین محصولات DNA را به میزان ۵ لاندا بعد از ترکیب با Loading dye (Thermo آمریکا) بر روی ژل اآگارز ۱ درصد لود شد. DNAهای حاصل تا زمان انجام ازمایش PCR در دمای ۲۰- ذخیره سازی شد.

آماده سازی پرایمرها و آزمایش PCR

برای آماده‌سازی پرایمرها که همگی از شرکت ماکروژن به سفارش شرکت پیشگام ایران تهیه شده بودند، بعد از اضافه کردن حجم اب مقطر درج شده بر روی تیوب به رقت اولیه ۱۰۰پیکومولار رسانده شد. سپس در رقت ۲۰ پیکومولار ازپرایمرها تهیه شد. بعد از قرار دادن پرایمرهای در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ساعت، رقت‌های استوک برای انجام آزمایشات بعدی تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شد. در این روند از پرایمرهای زیرجهت تکثیر ژنهای *aac(6')Ie/aph(2")*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* در نمونه‌های مورد نظر استفاده شد.

جدول ۱. لیست پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای شناسایی ژن‌های حضور ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2")*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک*‌های کواگولاز منفی

ژنهای مورد نظر	طول توالی	اندازه (bp)	رفرنس
aac(6')Ie/aph(2")	GAAGTACGCAGAAGAG ACATGGCAAGCTCTAGA	۴۵۱	Abdalو همکاران(۲۵)
aph(3')-IIIa1	AAATACCGCTGCGTA CATACTCTTCCGAGCAA	۲۴۲	Abdalو همکاران(۲۱)
ant(4')-Ia1	AATCGGTAGAAGCCCAA GCACCTGCCATTGCTA	۱۹۵	Abdalو همکاران(۲۱)
mecA	GTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGC GTCAACGATTGTGACACGATAGC	۵۴۴	Noguchi و همکاران(۲۶)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

جهت انجام واکنش PCR برای هر ژن، ۲۵میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۱میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس 2x and 1.5 mM MgCl2 (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل Tris-Hcl PH8.5, (NH_4) SO_4, 3mM $Mgcl_2$, unit 0/2، MmdNTP 4/4 ، 0.2%Tween20 Insert red dye and ، Ampliqon polymeras stabilizer بود، برای تهیه میکس اولیه مورد استفاده قرار گرفت. برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد(۱۴). آزمون PCR برای ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Corbett CGI-96(آمریکا) طبق الگوی زیر برای تنظیم گردید. در این آزمون از *استافیلوکوک اورئوس* ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی ثانویه در ۹۵ درجه به مدمت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت۵۰ ثانیه برای ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* در دمای ۵۵ درجع سانتی‌گراد و برای ژن‌های *aph(3')-IIIa1* و *ant(4')-Ia1* ۵۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد نظر گرفته شد. تکثیر اولیه هم به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد لحاظ گردید. برای تکثیر نهایی هم در مدت زمان ۱۰دقیقه از دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل اگارز۱/۵درصد

محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد شناسایی شدند. به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱/۵ درصد در بافر ۰/۵X الکتروفورز گردید. برای رنگ‌دهی به ژل، به آن ۵ میکرولیتر محلول Gel Red(ساخت Biotium آمریکا) اضافه شد و خوب هم زده شد. سپس در زیر نور ماورای بنفش در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از نشانگر مولکولی فرمنتاز(Thermofisher آمریکا)با توالی ۱۰۰جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داک Gel Documentation system CCD (CCD-Tab1 کیاژن ایران) عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد بررسی، تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش‌های آماری توصیفی(تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد. هم‌چنین آزمون آماری K2 برای مقایسه یافته‌های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسه یافته‌های کمی مورد استفاده قرار گرفتند. در این مطالعه مقدار $p\leq ۰/۵۰$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه برای غربال‌گری اولیه ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین در *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از روش تعیین حداقل غلظت مهاری توسط نوارهای E-test اوگزاسیلین و برای تعیین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از نوارهای E-test جنتامایسین و آمیکاسین استفاده شد. در *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از ۶۸ ایزوله ۴۱ (۶۰/۲۹ درصد) ایزوله دارای حداقل غظت‌های مهاری بیشتر از ۰/۵ میکروگرم بر میلیرلیتر برای اوگزاسیلین و ۲۴ ایزوله (۵۳/۳۳ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند(جدول ۲). در غربال‌گری اولیه برای تعیین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، از ۶۸ *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* ۱۵ ایزوله (۲۲/۰۵ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جنتامایسین، ۱۰ ایزوله(۶/۸ درصد) دارای حداقل مهاری بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۹ ایزوله (۵/۶ درصد)دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از از ۶۴ ایزوله و ۳ ایزوله (۴/۴ درصد)دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

بر میلی‌لیتر بودند. از ۴۵ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* هم ۶ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جنتامایسین، ۸ ایزوله دارای حداقل مهاری بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین،۳ ایزوله (۴/۴ درصد)دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از از ۶۴ ایزوله و ۱ ایزوله(۲/۲ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند(جدول ۲). بیش‌ترین ایزوله *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از بخش‌های اطفال و بیماران سرپایی به دست آمده که مربوط به نمونه‌های زخم و ادرار بودند(جدول ۴). هم‌چنین بیش‌ترین میزان جداسازی این باکتری از بیماران مونث بود(جدول ۳). از این مقدار، ۳۹ ایزوله(۵۷/۳۵ درصد)دارای ژن *mecA* بودند. علاوه بر این، ۱۳ ایزوله(۱۹/۱۱ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۹ ایزوله(۱۳/۲۳ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲ ایزوله(۲/۲ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند(نمودار ۱). از نظر فراوانی ژن‌ها بر اساس نمونه‌های بالینی بیش‌تری میزان ژن‌ها از نمونه‌های زخم و ادرار و خون جداسازی شدند که از بیماران بخش‌های اطفال، ICU و بیماران مراجعه کننده به صورت سرپایی گرفته شده بودند(جدول ۳). از ۴۵ ایزوله بالینی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس به دست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستانی و هم‌چنین بیماران سرپایی مراجعه کننده، بیش‌ترین نمونه‌های مربوط به زخم و ادرار بود. علاوه بر این، ۸ ایزوله(۱۷/۷۷ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۴ ایزوله(۸/۸ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲ ایزول ۴/۴ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند(نمودار ۱).

جدول۲. الگوی حساسیت ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* با روش تعیین حداقل غلت مهاری با استفاده از نوارهای E-test

آنتی بیوتیک	حداقل غلظت مهار کنندگی استافیلوکوکوک های کواگولاز منفی (n=۱۱۳)					
	اپیدرمیدیس (n=۶۸)			ساپروفیتیکوس (n=۴۵)		
	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم
اوگزاسیلین	۲۷(٪ ۳۶/۷)	۰	۴۱(٪ ۶۰/۲۹)	۲۱(٪ ۲۲/۶۸)	۰	۲۴(٪ ۵۳/۳۳)
آمیکاسین	۴۹(٪ ۷۲/۰۵)	۴(٪ ۵/۸)	۱۵(٪ ۲۲/۰۵)	۳۷(٪ ۸۲/۲۲)	۲(٪ ۴/۴)	۶(٪ ۱۳/۳۳)
جنتامایسین	۵۶(٪ ۸۲/۳۵)	۳(٪ ۴/۴)	۱۰(٪ ۶/۸)	۲۶(٪ ۵۷/۷۷)	۱۱(٪ ۲۴/۴۴)	۸(٪ ۱۷/۷۷)
کانامایسین	۵۳(٪ ۷۷/۹۴)	۶(٪ ۸/۸)	۹(٪ ۵/۶)	۳۵(٪ ۷۷/۷۷)	۷(٪ ۱۵/۵۵)	۳(٪ ۶/۶)
توبرامایسین	۶۵(٪ ۹۵/۵۸)	۰	۳(٪ ۴/۴)	۴۳(٪ ۹۵/۵۵)	۱(٪ ۲/۲)	۱(٪ ۲/۲)

جدول۳. فراوانی حضور ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2'')* ،*aph(3')-IIIa1* ،*ant(4')-Ia1* و *mecA* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* بر اساس نمونه های بالینی جدا شده

بخش جداشده	استافیلوکوک های کواگولاز منفی (n=۱۱۳)							
	mecA (n=۶۲)		*aac (6') Ie/aph (2'')* (n=۴۵)		*aph (3')-IIIa1* (n=۴۲)		*ant (4')-Ia1* (n=۴۸)	
	اپیدرمیدیس (n=۳۹)	ساپروفیتیکوس (n=۲۳)	اپیدرمیدیس (n=۳۲)	ساپروفیتیکوس (n=۱۳)	اپیدرمیدیس (n=۳۱)	ساپروفیتیکوس (n=۱۱)	اپیدرمیدیس (n=۲۹)	ساپروفیتیکوس (n=۱۹)
خون	۴ (٪ ۸/۱)	۱ (۱/۶)	۱ (٪ ۲)	۲ (٪ ۴)	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۴ ٪ ۱۴
ادرار	۰	۰	۴ (٪ ۸)	۱	۲ (٪ ۴)	۰	۰	۱ ٪ ۸
کاتاتر	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۱ (٪ ۴)	۰	۱ (۱/۶)	۲ (٪ ۴)	۱ ٪ ۸
زخم	۰	۰	۰	۱ (٪ ۱)	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۰
ترشحات	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۰	۰	۰	۰	۱

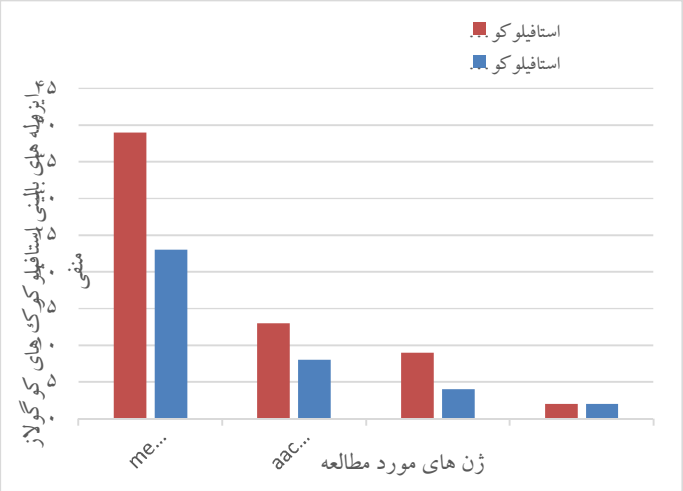
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

جدول٤. فراوانی حضورژنهای (*aac(6')Ie/aph(2"*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* در ایزوله های بالینی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس* بر اساس بخش های جدا شده

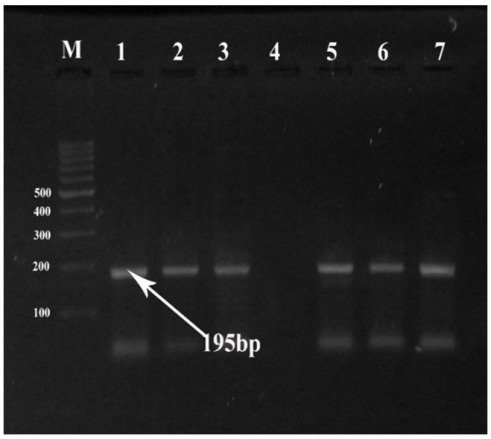
بخش جداشده	استافیلوکوک های کواگولاز منفی (n=۱۱۳)							
	mecA (n=۶۲)		*aac (6') Ie/aph (2")* (n=۴۵)		*aph (3')-IIIa1* (n=۴۲)		*ant (4')-Ia1* (n=۴۸)	
	اپیدرمیدیس (n=۳۱)	ساپروفیتیکوس (n=۱۱)	اپیدرمیدیس (n=۲۹)	ساپروفیتیکوس (n=۱۹)	اپیدرمیدیس (n=۳۱)	ساپروفیتیکوس (n=۱۱)	اپیدرمیدیس (n=۲۹)	ساپروفیتیکوس (n=۱۹)
اطفال	۴ (٪ ۸/۱)	۱ (۱/۶)	۱ (٪ ۲)	۲ (٪ ۴)	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۴ ٪ ۱۴
ICU	۰	۰	۴ (٪ ۸)	۱	۲ (٪ ۴)	۰	۰	۱ ٪ ۸
داخلی – جراحی	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۱ (٪ ۴)	۰	۱ (۱/۶)	۲ (٪ ۴)	۱ ٪ ۸
P-ICU	۰	۰	۰	۱ (٪ ۱)	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۰
N-ICU	۰	۰	۱ (٪ ۲)	۰	۰	۰	۰	۱
بیماران سرپایی	۲۳ (٪ ۴۶/۹۳)	۱۹ (۳۱/۶۶)	۵ (٪ ۱۰)	۰	۰	۰	۰	۰
زنان	۱۳ (٪ ۲۶/۵۳)	۸	۲ (٪ ۴)	.	۱ (٪ ۲)	۰	۰	۴
خون شناسی	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	۲

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

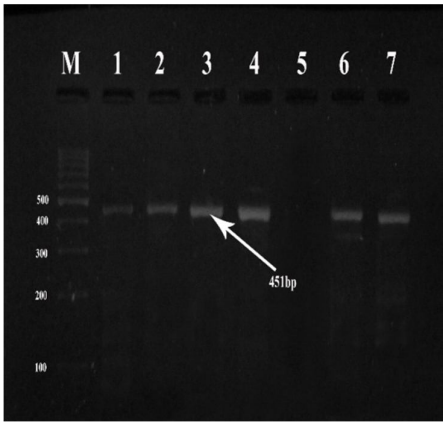
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017



نمودار ۱ .توزیع فراوانی ژن های *aac(6')Ie/aph(2")*، *aph(3')-IIIa1*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* در ایزوله های بالینی *استافیلوکوک* های کوگولاز منفی

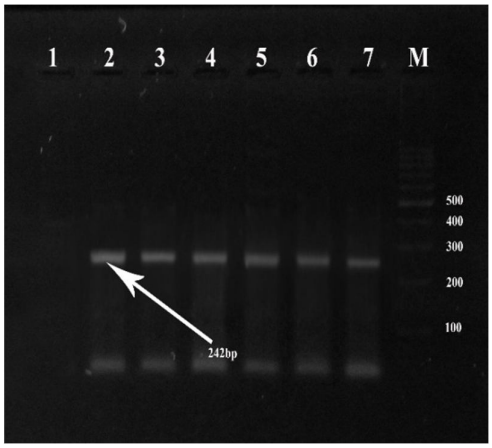


شکل ۱. انجام PCR بر روی ژن *ant(4')-Ia1* با طول ۱۹۵جفت باز . چاهک٦: کنترل مثبت سویه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ATCC12228 . چاهک ٤ کنترل منفی سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* ATCC25923 .M:مارکر۱۰۰جفت بازی. چاهک های ۱،۲،۳،۷: نمونه های مثبت از نظر حضور ژن



شکل۲. انجام PCR بر روی ژن *aac(6')Ie/aph(2")* با طول ٤٥١جفت باز. چاهک٦: کنترل مثبت سویه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ATCC12228 . چاهک ٥ کنترل منفی سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 .M:مارکر۱۰۰جفت بازی. چاهک های ۱تا٤و۷: نمونه های مثبت از نظر ژن.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017



شکل۳. انجام PCR بر روی ژن *aph(3')-IIIa1* با طول ۲۴۲جفت باز. چاهک۲: کنترل مثبت سویه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ATCC12228 . چاهک ۱ کنترل منفی سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* M. ATCC25923:مارکر۱۰۰جفت بازی. چاهک های ۳تا۷: نمونه های مثبت از نظر ژن.

بحث

آمینوگلیکوزیدها، از آن دست از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند که حتی با داشتن عوارض جانبی مانند سمیت‌های کلیوی و اختلالات شنوایی که با مصرف آنها پدیدار می‌شود، کماکان در درمان عفونت‌های *استافیلوکوکی* کاربرد دارند که ارزش بالای این آنتی بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. آمینوگلیکوزیدها هم‌چنین با خاصیت هم افزایی خود در مواقعی که با آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی و گلیکوپپتیدی استفاده می‌شوند، می‌توانند اثر بخشی خود را افزایش دهند. این امر باعث شده است که در برخی موارد مقاومت‌های بتالاکتامی زمینه مساعدی را برای مقاومت‌های آمینوگلیکوزیدی فراهم کند. نتایج حاصل از این مطالعه بیان کننده مقاومت بالای بتالاکتامی در ایزوله‌های استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپی درمیدیس می‌باشد. این در حالی است که ارتباط معنی‌داری بین نوع نمونه‌های اخذ شده و گونه باکتریایی جدا شده یافت نشد($p\leq0/05$). بیش‌ترین موارد جدا شده از ایزوله‌های بالینی جدا شده از بیماران دارای جنسیت مونث بود که بیش از ۶۰ درصد از نمونه‌های دارای مقاومت به متی سیلین از زنان جدا شد، هم‌چنین بین جنسیت بیمارانی که از آن‌ها نمونه باکتریایی به دست آمده بود و نوع باکتری جداسازی شده ارتباطی دیده نشد($p\leq0/05$). جهت سنجش اولیه مقاومت به متی سیلین در ایزوله‌های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از روش تعیین حداقل غلظت مهاری به واسطه نوارهای E-test اوگزاسیلین استفاده شد. در این میان از ۶۸ ایزوله استافیلوکوک اپیدرمیدیس جدا شده از نمونه‌های بالینی ۳۶ ایزوله(۵۲/۹۴ درصد) دارای مقاومت به متی سیلین بودند و از ۴۵ ایزوله بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس*۲۴ ایزوله(۵۴/۳۳ درصد) دارای مقاومت فنوتیپی به متی سیلین بودند که از این نظر با مطالعه سبزهالی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تهران و قوتاسلو و همکاران در تبریز در سال ۲۰۱۴ انجام شده بود مطابقت دارد(۲۷، ۲۸). به دلیل این‌که آنزیم‌های محدود کننده آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی گروه خاصی از آنتی بیوتیک‌ها را تخریب می‌کنند، برای تعیین مقاومت آمینوگلیکوزیدی از ۴ آنتی بیوتیک جنتامایسین، توبرامایسین، کانامایسین و آمیکاسین استفاده شد. حداقل غلظت مهاری این آنتی بیوتیک‌ها که طیف کاملی از آنتی بیوتیک‌های تخریب شونده توسط آنزیم‌های مخرب تولید شده توسط سویه‌های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها می‌باشند، با استفاده از نوارهای E-Test تعیین شد. در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* ۱۵ ایزوله (۲۲/۰۵ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

برای جنتامایسین، ۱۰ ایزوله(۶/۸ درصد) دارای حداقل مهاری بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۹ ایزوله(۵/۶ درصد)دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از از ۶۴ ایزوله و ۳ ایزوله(۴/۴ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. نتایج به دست آمده با نتایجی که کلینبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ در کویت، ابدال و همکاران در قم در سال و قوتاسلو و همکاران در تبریز هر دو در سال ۲۰۱۴ گزارش داده بودند تقریبا هم‌خوانی داشته و با مطالعه رحیمی و همکاران که در سال ۲۰۱۵ در اصفهان انجام شده بود هم‌خوانی نداشت و میزان مقاومت به جنتامایسین و کانامایسین بالاتر از مواردی بود که در این مطالعه مشاهده شد(۱۸، ۲۹). بررسی ۴۵ ایزوله *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* از نظر مقاومت به آمینوگلیوزیدها هم نشان داد که ۶ (۱۳/۳۳ درصد) ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جنتامایسین، ۸ ایزوله (۱۷/۷۷ درصد) دارای حداقل مهاری بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۳ ایزوله (۴/۴ درصد)دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ ایزوله(۲/۲ درصد) دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. این نتایج به توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات کلینبرگ و همکاران در کویت در سال ۲۰۰۱ و قوتاسلو و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تبریز مطابقت دارد(۱۸، ۲۲). از طرفی با مطالعات چوئی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره مطابقت نداشت. در این مطالعه مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین بیش از ۶۰ درصد گزراش شده بود که با مواردی که در مطالعه ما به دست آمد، تفاوت قابل توجهی دارد(۳۰). این چنین تفاوت‌هایی که در برخی موارد در گزارشات گوناگون از مناطف مختلف دیده می‌شود را می‌توان به تغییر سویه متناسب با موقعیت جغرافیایی نسبت داد. به طوری که در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ توسط اشمیتز در اروپا انجام شد، شیوع فنوتیپی مقاومت به جنتامایسین و آمیکاسین را بیش از ۳۰ درصد گزارش کرده بودند که با موارد مورد مطالعه در زاهدان کاملا تفاوت دارد(۳۱). بیش‌ترین ایزوله *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از بخش‌های اطفال و بیماران سرپایی به دست آمده که مربوط به نمونه‌های زخم و ادرار بودند نتایج این موارد هم با مطالعات اشمیتز و همکاران در سال ۱۹۹۹ هم‌خوانی داشت. از نظر پراکنش ژنی در ایزوله‌های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* هم، ۱۳ ایزوله(۱۹/۱۱ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۹ ایزوله(۱۳/۲۳ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲ ایزوله(۲/۲ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند. موارد به دست آمده با نتایج سبزهالی و همکاران از نظر پراکنش ژن‌های *aac(6')Ie/aph(2")*، و*aph(3')-IIIa1* مطابقت داشت و از نظر پراکنش ژن *ant(4')-Ia1* مطابقت نداشت و توزیع آن بیش از ۷۰ درصد گزارش شده بود که بیشتر از مطالعه حاضر است(۲۰). مطالعات آردیک و همکاران در سال ۲۰۰۶ در ترکیه نشان دهنده شیوع بیشتر این ژن‌ها در *استافیلوکوک*ها بود که با نتایج به دست آمده در مطالعه ما هم‌خوانی نداشت(۳۲). از نظر فراوانی ژن‌ها بر اساس نمونه‌های بالینی بیشتری میزان ژن‌ها از نمونه‌های زخم و ادرار و خون جداسازی شدند که از بیماران بخش های اطفال، ICU و بیماران مراجعه کننده به صورت سرپایی گرفته شده بودند که در مطالعات بهات و همکاران در هند در سال و بوتین و همکاران در فرانسه هر دو در سال ۲۰۱۶ همخوانی دارد به طوری که در این مطالعات تعدد نمونه‌های گرفته شده از بخش‌های مراقبت‌های ویژه بسیار بالا گزارش شده اند(۳۳، ۳۴). از ۴۵ ایزوله بالینی *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* به دست آمده از بخش‌های مختلف بیمارستانی و هم‌چنین بیماران سرپایی مراجعه کننده، بیش‌ترین نمونه‌های مربوط به زخم و ادرار بود. علاوه بر این، ۸ ایزوله(۱۷/۷۷ درصد) دارای ژن *aac(6')Ie/aph(2")*، ۴ ایزوله(۸/۸ درصد) دارای ژن *aph(3')-IIIa1* و ۲ ایزول۴/۴ درصد) دارای ژن *ant(4')-Ia1* بودند. ژن *aac(6')Ie/aph(2")* با فراوانی بیش از ۱۵ درصد، بیش‌ترین شیوع را در بین *استافیلوکوک*های *ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک*

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

اپیدرمیدیس داشت. این افزایش فراوانی به دلیل حضور این ژن بر روی ترانسپوزون Tn4001 می‌باشد که سبب گردش این ژن در بین استافیلوکوک‌ها می‌شود. ژن *aph(3')-IIIa1* هم بعد از ژن *aac(6')Ie/aph(2")* بیش‌ترین فراوانی را در هر دو گونه داشت. این نتایج با مطالعاتی که در کشورهای هند، مصر، کره، ترکیه و همان هم‌خوانی داشت(۳۵- ۳۷). از نظر ژنتیکی این ژن بر روی ترانسپوزون Tn4505 حمل می‌شود که ممکن است در کروموزوم یا پلاسمید قرار گرفته باشد. در کنار این دو ژن، ژن *ant(4')-Ia1* کمترین فراوانی را در دو گونه مورد بررسی داشت.

نتیجه گیری

با توجه به مقطعی بودن این مطالعه و عدم دسترسی به نمونه‌های بیشتر و زمان طولانی‌تر نمی‌توان به قطعیت در مورد شیوع این ژن‌ها در شهر زاهدان اظهار نظر کرد، اما با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه آن با نتایجی که از سایر شهرها ایران گزارش شده است، شهر زاهدان دارای وضعیتی به مراتب بهتر می‌باشد. البته نباید از این مورد چشم پوشی کرد که مقاومت به متی سیلین و حضور ژن‌ها عامل مقاومت در این مطالعه به وفور دیده شد که ناشی از مصرف نادرست آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌باشد. در نهایت باید با کنترل مصرف آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی در درمان عفونت‌های *استافیلوکوکی*، در کم کردن این مقاومت‌ها و ریشه کنی سویه‌های مقاوم اقدام کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارشناسان محترم گروه میکروب شناسی آقایان ده مرده و آتشگر، همکاران بخش میکروب شناسی آزمایشگاه رفرانس و مرکز تحقیقات عفونی-گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, McTavish SM, et al. Combinations of beta-lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PloS one. 2015;10(2)0117-664.
2. Zuo GY, Han ZQ, Hao XY, Han J, Li ZS, Wang GC. Synergy of aminoglycoside antibiotics by 3-Benzylchroman derivatives from the Chinese drug Caesalpinia sappan against clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Phytomedicine. 2014;21(7):936-41.
3. Martins A, Riboli DFM, Camargo CH, Pereira VC, de Almeida Sampaio R, de Souza da Cunha MdLR. Antimicrobial resistance and persistence of Staphylococcus epidermidis clones in a Brazilian university hospital. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2013;77(2):164-8.
4. Krediet TG, Fleer A, Gerards LJ. Development of resistance to aminoglycosides among coagulase-negative staphylococci and enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit. The Journal of hospital infection. 1993;24(1):39-46.
5. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. Clinical Microbiology Reviews. 2014;27(4):870-926.
6. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Veterinary microbiology. 2009;134(1-2):45-54.
7. Tabata M, Shimizu M, Araake M, Ogawa H. [Relationship between arbekacin-susceptibility and aminoglycoside-resistant gene of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)]. The Japanese journal of antibiotics. 2003;56(1):36-43.
8. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel mecA homologue mecC. EMBO molecular medicine. 2013;5(4):509-15.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

9. Xu Z, Mkrtchyan HV, Cutler RR. Antibiotic resistance and mecA characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Frontiers in microbiology. 2015;6(2):94-7.

10. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. The Pediatric infectious disease journal. 2005;24(9):817-22.

11. Mombach Pinheiro Machado AB, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. Journal of medical microbiology. 2007;56(10):1328-33.

12. Greninger AL, Chatterjee SS, Chan LC, Hamilton SM, Chambers HF, Chiu CY. Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Resistant to Fifth-Generation Cephalosporins Reveals Potential Non-mecA Mechanisms of Resistance. PloS one. 2016;11(2):149541.

13. Couto I, de Lencastre H, Severina E, Kloos W, Webster JA, Hubner RJ, et al. Ubiquitous presence of a mecA homologue in natural isolates of Staphylococcus sciuri. Microbial drug resistance. 1996;2(4):377-91.

14. Jacob J, Meers PD. Partial characterization of an endemic strain of a methicillin- and aminoglycoside-resistant Staphylococcus aureus (MARSA) homogeneously resistant to beta-lactam antibiotics. The Journal of hospital infection. 1992;21(2):121-9.

15. Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aurous and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. koomesh. 2014;16(1):82-9.

16. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. International journal of antimicrobial agents. 2009;33(3):264-5.

17. 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(9):3115-21.

18. Fujimura S, Tokue Y, Takahashi H, Nukiwa T, Watanabe A. Specificity of 4'''-acetylation by an aminoglycoside-modifying enzyme in arbekacin-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Tohoku J Exp Med. 1998;186(1):67-70.

19. Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. Diagnostic microbiology and infectious disease. 1998;30(3):205-14.

20. Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005;51(1):57-62.

21. CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.

22. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the Cefoxitin Disk Test Reliable Enough to Detect

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 15:04 +0430 on Wednesday July 26th 2017

Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci? Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(4):2028-9.
23. Antunes A.L.S., Secchi C., Reiter K.C., et al. Feasible identification of Staphylococcus epidermidis using desferrioxamine and fosfomycin disks. APMIS, 2008;12(9):12-39.
24. Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(6):2119-25.
25. Ghotaslou R, Aghazadeh M, Ahangarzadeh Rezaee M, Moshafi MH, Forootanfar H, Hojabri Z, et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes among coagulase negative staphylococci in Iranian pediatric patients. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 2014;20(9):569-73.
26. Sabzehali F, Gudarzi M, Goudarzi H. Determination of antibiotic resistance in clinical isolates of coagulase negative Staphylococci from hospitalized patients in selected hospitals of Tehran. 2015. 2015;6(2).
27. Glad T, Klingenberg C, Flaegstad T, Ericson JU, Olsvik O. Rapid detection of the methicillin-resistance gene, mecA, in coagulase-negative Staphylococci. Scandinavian journal of infectious diseases. 2001;33(7):502-6.
28. Lim JA, Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. J Antimicrob Chemother. 2002;49(10).211-223.
29. Shmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother 1999; (43):253-259.
30. Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. International journal of antimicrobial agents. 2005;26(11)309-321.
31. Butin M, Rasigade JP, Martins-Simões P, Meugnier H, Lemriss H, Goering RV, et al. Wide geographical dissemination of the multiresistant Staphylococcus capitis NRCS-A clone in neonatal intensive-care units. Clinical Microbiology and Infection. 2016;22(1):46-52.
32. Bhatt P, Tandel K, Singh A, Mugunthan M, Grover N, Sahni AK. Species distribution and antimicrobial resistance pattern of Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care centre. Medical Journal Armed Forces India. 2016;72(1):71-4.
33. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res 2012; (135): 389-396.
34. 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): 701-705.
35 .Sorour AE, El-Awady BA, Mukhtar AM. Co-existance of aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes and mecA gene among nosocomial isolates of Staphylococcus aureus in surgical intensive care units in kasr Al-Ainy hospitals, Cairo University. Int Arabic J Antimicrob Agents 2013; 3: 1.