

## 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<sup>1</sup>, Javad Adabi<sup>2</sup>, Behroz Zeyni<sup>3</sup>, Hamed Tahmasebi<sup>2\*</sup>

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

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

محمدبکائیان<sup>۱</sup>، جواد ادبی<sup>۲</sup>، بهروز زینی<sup>۳</sup>، حامدطهماسبی<sup>۴\*</sup>

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 آنتی‌بیوتیک‌های بتا‌لاکتامی برای درمان بسیاری از عفونت‌های استافیلوکوکی کاربرد دارند. بروز مقاومت در سویه‌های مقاوم به واسطه آنزیم‌هایی صورت می‌گیرد که توسط ژن‌های موثری تولید می‌شوند که سبب تخریب ساختار آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌گردند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن‌های *ant(4')*-*Ia1*، *aph(3')*-*IIIa1*، *aac(6')**Ie/aph(2'')* 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 ۱۱۳ ایزوله (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.

**نتیجه‌گیری:** با بررسی آماری انجام شده مشخص شد که شیوع ژن‌های آمینوگلیکوزیدی در بین ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین بیشتر می‌باشد و این امر بیان‌کننده این است که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین شرایط مناسبی را برای کسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های 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

## مقدمه

آمینوگلیکوزیدها از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که به همراه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی با منشأ 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 کوآگولاز منفی (CoNs) یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌ها در ایجاد عفونت‌های ناشی از به کارگیری کاتترهای بیمارستانی و آلودگی ناشی از تامپون‌های بهداشتی است (۳). گسترش این باکتری‌ها در مناطق مختلف و استفاده بی‌رویه از گروه‌های آنتی‌بیوتیکی متفاوت، خصوصاً بتالاکتام‌ها، برای درمان بیماران مبتلا به این باکتری، زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاومی شده است (۴). از این میان می‌توان به، استافیلوکوک اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین یا Methicillin- (MRSE)

*Resistant Staphylococcus Epidermidis* و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس مقاوم به متی‌سیلین یا *Methicillin-Resistant Staphylococcus Saprophyticus* (MRSS) اشاره کرد (۳، ۵). شیوع بالای این سویه‌ها در نمونه‌های بالینی و دامی، خصوصاً 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 پنی‌سیلین (Binding Protein: PBP-Penicillin) تغییر یافته است و تمایل کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام نشان می‌دهد (۸، ۹). PBP2A و PBP4 انواع دیگری از PBP هستند که به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی‌سیلین، 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 متی‌سیلین 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 کوآگولاز منفی مصرف می‌شوند، مقاومت به متی‌سیلین می‌تواند زمینه‌ساز مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را فراهم کند (۱۴، ۱۵). آمینوگلیکوزیدها با اتصال به زیر واحد 30S ریبوزومی سبب قطع مکانیسم ترجمه باکتری شده و اثرات ضدباکتریایی خود را اعمال می‌کنند (۱۶). مقاومت به آمینوگلیکوزیدها 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-Modifying Enzymes: AME) از اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت در گونه‌های استافیلوکوکی است (۱۷). مبنای رده‌بندی این آنزیم‌ها فعالیت تغییر دهنده‌گی آن‌ها می‌باشد که بر این اساس به سه رده مختلف طبقه‌بندی می‌شوند و شامل: آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها، (Aminoglycoside-acetyltransferase: AACs) آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferase: APHs) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferase: ANTs) هستند (۱۳، ۱۸). سه آنزیم *APH(3')*-III، *AAC(6')*/*APH(2')* و *ANT(4')* که به ترتیب توسط ژن‌های *aac(6')*-*ant(4')*-Ia *aph(3')*-IIIa *Je/aph(2')* 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 تخریب‌کننده آنتی‌بیوتیک‌های 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

برای تفکیک استافیلوکوک‌های کوگولاز مثبت از استافیلوکوک‌های کوگولاز منفی از تست کوگولاز لوله‌ای استفاده شد. برای شناسایی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس از استافیلوکوک اپیدرمیدیس علاوه بر استفاده از دیسک‌های نوویوسین 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 بی‌هوازی، برای جداسازی این دو گونه از یکدیگر انجام گرفت. در روش دیسک انتشاری ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هیتون 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 نوویوسین ۳۰ میکروگرم، باستراسین ۱۰ میکروگرم و پلی میکسین B ۱۰۰ واحدی استافیلوکوک اپیدرمیدیس را از استافیلوکوک ساپروفیتیکوس جدا می‌کنیم. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک نوویوسین بیشتر از ۱۶ میلی‌متر، نسبت به پلی میکسین B بیشتر از ۱۰ میلی‌متر و نسبت به باستراسین 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 فسفوماپسین و دیسفریوکسامین استفاده شد و نمونه‌هایی که برای آنتی بیوتیک فسوماپسین دارای قطر هاله بیشتر از ۳۰ میلی‌متر 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

دقت و سرعت تشخیص دارای حساسیت و ویژگی کمتری نسبت به روش‌های ژنوتیپی هستند. این روش، 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 باکتریایی بودند. نمونه‌های کشت داده شده که از بیماران دارای عفونت‌های خون، زخم، آلودگی با سوند و کاتتر 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- نگهداری 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

شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح شد و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر (۲۰ ساعت)، 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 آگارز ۱ درصد لود شد. DNAهای حاصل تا زمان انجام آزمایش 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 ۱۰۰ پیکومولار رسانده شد. سپس در رقت ۲۰ پیکومولار از پرایمرها تهیه شد. بعد از قرار دادن پرایمرهای در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت، رقت‌های استوک برای انجام آزمایشات بعدی تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شد. در این روند از پرایمرهای زیرجهت تکثیر ژنهای *aph(3')-IIIa1 aac(6')Ie/aph(2'')*، *ant(4')-Ia1* و *mecA* در نمونه‌های مورد نظر استفاده شد.

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 متی‌سیلین به واسطه تعیین حداقل مهارتی (MIC) با استفاده از نوارهای E-test اوگراسیلین (liofilchem ایتالیا) تعیین شد. برای این کار ابتدا کلنی‌های جداسازی شده از باکتری‌های به دست آمده را به صورت چمنی بر روی محیط‌های Merck)MHA (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 قبلاً درون لوله‌های درب‌دار

جدول ۱. لیست پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای شناسایی ژن‌های حضور ژن‌های *aph(3')-IIIa1 aac(6')Ie/aph(2'')*

*ant(4')-Ia1* و *mecA* ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک‌های کواکولاز منفی

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

اندازه محصولات از نشانگر مولکولی فرمتناز (Thermofisher آمریکا) با توالی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داگ (Gel Documentation system CCD) CCD-Tab1 کایژن ایران) عکس برداری 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  $p \leq 0.05$  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 مهارت توسط نوارهای E-test اوگراسیلین و برای تعیین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها از نوارهای E-test جنتامایسین و آمیکاسین استفاده شد. در استافیلوکوک اپیدرمیدیس از ۶۸ ایزوله (۶۰/۲۹ درصد) ایزوله دارای حداقل غلظت‌های مهارت بیشتر از ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اوگراسیلین و ۲۴ ایزوله (۵۳/۳۳ درصد) دارای حداقل غلظت مهارت 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 مهارت بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جنتامایسین، ۱۰ ایزوله (۶/۸ درصد) دارای حداقل مهارت بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۹ ایزوله (۵/۶ درصد) دارای حداقل غلظت مهارت بیشتر از ۶۴ ایزوله و ۳ ایزوله (۴/۴ درصد) دارای حداقل غلظت مهارت بیشتر از ۱۶ میکروگرم

جهت انجام واکنش PCR برای هر ژن، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس 2x and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (شرکت Ampliqon آلمان) که شامل Tris-Hcl PH8.5, (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub>, 3mM Mgcl<sub>2</sub>, 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 مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۵۰ ثانیه برای ژن *aac(6')* *Ie/aph(2')* در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و برای ژن‌های *aph(3')* *IIIa1* و *ant(4')* *Ial* 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 ۱۰ دقیقه از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

### الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز/۱ درصد

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 آگارز 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

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).

بر میلی‌لیتر بودند. از ۴۵ ایزوله استافیلوکوک ساپروفیتیکوس هم ۶ ایزوله دارای حداقل غلظت مهاری بیشتر از ۱۶ میکروگرم 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 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')*

جدول ۲. الگوی حساسیت ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس با روش تعیین حداقل غلظت مهاری با استفاده از نوارهای E-test

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

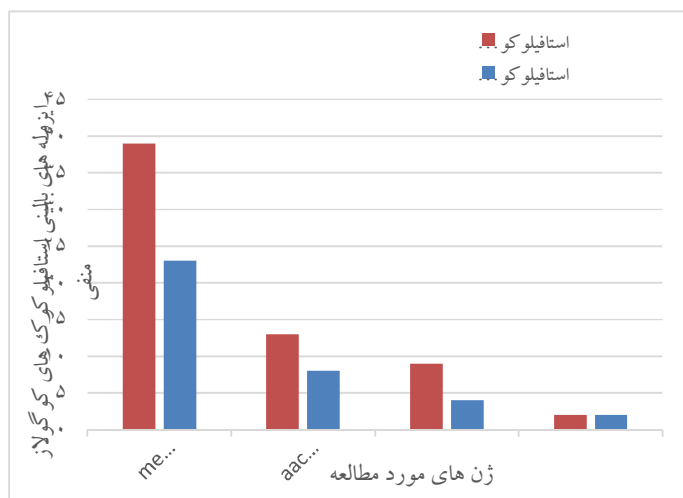
جدول ۳. فراوانی حضور ژن‌های *ant(4')* *-Ia1 aph(3')* *-IIIa1 aac(6')* *Ie/aph(2')* و *mecA* در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بر اساس نمونه‌های بالینی جدا شده

استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی (n=۱۱۳)								بخش جدا شده
<i>ant (4')-Ia1</i> (n=۴۸)		<i>aph (3')-IIIa1</i> (n=۴۲)		<i>aac (6') Ie/aph (2')</i> (n=۴۵)		<i>mecA</i> (n=۶۲)		
ساپروفیتیکوس (n=۱۹)	اپیدرمیدیس (n=۲۹)	ساپروفیتیکوس (n=۱۱)	اپیدرمیدیس (n=۳۱)	ساپروفیتیکوس (n=۱۳)	اپیدرمیدیس (n=۳۲)	ساپروفیتیکوس (n=۲۳)	اپیدرمیدیس (n=۳۹)	
۴	۱	۰	۰	۲	۱	۱	۴	خون
% ۱۴	(% ۲)			(% ۴)	(% ۲)	(۱/۶)	(% ۸/۱)	
۱	۰	۰	۲	۱	۴	۰	۰	ادرار
% ۸			(% ۴)		(% ۸)			
۱	۲	۱	۰	۱	۱	۰	۰	کاناتر
% ۸	(% ۴)	(۱/۶)		(% ۴)	(% ۲)			
۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	زخم
	(% ۲)			(% ۱)				
۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	ترشحات
					(% ۲)			

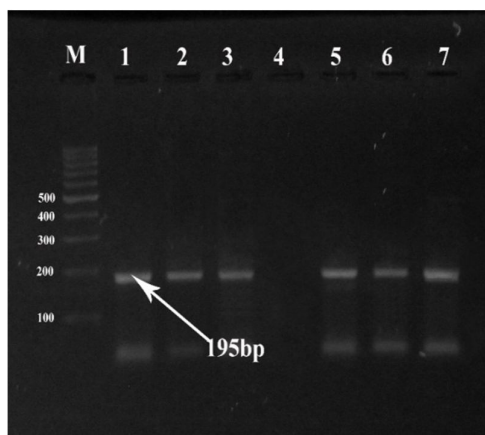


جدول ۴. فراوانی حضور ژن‌های *ant(4')-Ia1 aph(3')-IIIa1 aac(6')Ie/aph(2'')* و *mecA* در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اپیدرمیدیس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بر اساس بخش‌های جدا شده

استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی (n=۱۱۳)								بخش
								جدا شد
								ه
<i>ant (4')-Ia1</i> (n=۴۸)		<i>aph (3')-IIIa1</i> (n=۴۲)		<i>aac (6') Ie/aph (2'')</i> (n=۴۵)		<i>mecA</i> (n=۶۲)		
سائپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سائپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سائپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	سائپروفیتیکوس	اپیدرمیدیس	
(n=۱۹)	(n=۲۹)	(n=۱۱)	(n=۳۱)	(n=۱۹)	(n=۲۹)	(n=۱۱)	(n=۳۱)	
۴	۱	۰	۰	۲	۱	۱	۴	اطفال
% ۱۴	(% ۲)			(% ۴)	(% ۲)	(۱/۶)	(% ۸/۱)	
۱	۰	۰	۲	۱	۴	۰	۰	ICU
% ۸			(% ۴)		(% ۸)			
۱	۲	۱	۰	۱	۱	۰	۰	داخلی
% ۸	(% ۴)	(۱/۶)		(% ۴)	(% ۲)			-
۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	جراحی
	(% ۲)			(% ۱)				P- ICU
۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	N- ICU
					(% ۲)			
۰	۰	۰	۰	۰	۵	۱۹	۲۳	بیماران سرپایی
					(% ۱۰)	(۳۱/۶۶)	(% ۴۶/۹۳)	
۴	۰	۰	۱	۰	۲	۸	۱۳	زنان
			(% ۲)		(% ۴)		(% ۲۶/۵۳)	
۲	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۰	خون شناسی



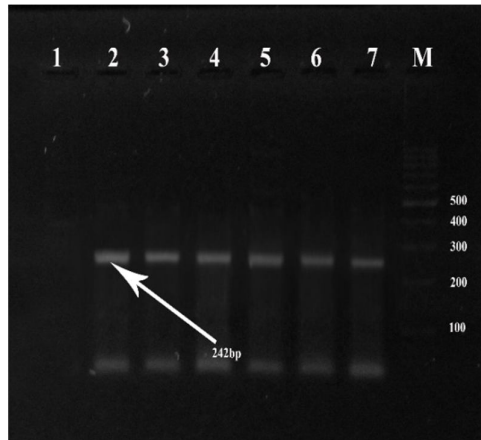
نمودار ۱. توزیع فراوانی ژن های (*ant(4')-Ia1 aph(3')-IIIa1 aac(6')Ie/aph(2'')* و *mecA* در ایزوله های بالینی استافیلوکوک های کوگولاز منفی



شکل ۱. انجام PCR بر روی ژن *ant(4')-Ia1* با طول ۱۹۵ جفت باز. چاهک ۶: کنترل مثبت سویه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ATCC12228. چاهک ۴: کنترل منفی سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک های ۱، ۲، ۳، ۷: نمونه های مثبت از نظر حضور ژن



شکل ۲. انجام PCR بر روی ژن *aac(6')Ie/aph(2'')* با طول ۴۵۱ جفت باز. چاهک ۶: کنترل مثبت سویه استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ATCC12228. چاهک ۵: کنترل منفی سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک های ۱ تا ۷: نمونه های مثبت از نظر ژن.



شکل ۳. انجام PCR بر روی ژن *aph(3')-IIIa1* با طول ۲۴۲ جفت باز. چاهک ۲: کنترل مثبت سویه *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* ATCC12228. چاهک ۱ کنترل منفی سویه استاندارد *استافیلوکوک اورئوس* M. ATCC25923: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک های ۳ تا ۷: نمونه های مثبت از نظر ژن.

#### بحث

آمینوگلیکوزیدها، از آن دست از آنتی بیوتیک ها می باشند که حتی با داشتن عوارض جانبی مانند سمیت های کلیوی و اختلالات شنوایی که با مصرف آنها پدیدار می شود، کماکان در درمان عفونت های *استافیلوکوکی* کاربرد دارند که ارزش بالای این آنتی بیوتیک ها را نشان می دهد. آمینوگلیکوزیدها هم چنین با خاصیت هم افزایی خود در مواقعی که با آنتی بیوتیک های بتالاکتامی و گلیکوپپتیدی استفاده می شوند، می توانند اثر بخشی خود را افزایش دهند. این امر باعث شده است که در برخی موارد مقاومت های بتالاکتامی زمینه مساعدی را برای مقاومت های آمینوگلیکوزیدی فراهم کند. نتایج حاصل از این مطالعه بیان کننده مقاومت بالای بتالاکتامی در ایزوله های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپی درمیدیس* می باشد. این در حالی است که ارتباط معنی داری بین نوع نمونه های اخذ شده و گونه باکتریایی جدا شده یافت نشد ( $p \leq 0/05$ ). بیشترین موارد جدا شده از ایزوله های بالینی جدا شده از بیماران دارای جنسیت مونث بود که بیش از ۶۰ درصد از نمونه های دارای مقاومت به متی سیلین از زنان جدا شد، هم چنین بین جنسیت بیمارانی که از آن ها نمونه باکتریایی به دست آمده بود و نوع باکتری جدا سازی شده ارتباطی دیده

نشد ( $p \leq 0/05$ ). جهت سنجش اولیه مقاومت به متی سیلین در ایزوله های *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* از روش تعیین حداقل غلظت مهاري به واسطه نوارهای E-test اوگراسیلین استفاده شد. در این میان از ۶۸ ایزوله *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* جدا شده از نمونه های 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 این که آنزیم های محدود کننده آنتی بیوتیک های بتالاکتامی گروه خاصی از آنتی بیوتیک ها را تخریب می کنند، برای تعیین مقاومت آمینوگلیکوزیدی از ۴ آنتی بیوتیک جنتامایسین، تورامایسین، کانامایسین و آمیکاسین استفاده شد. حداقل غلظت مهاري این آنتی بیوتیک ها که طیف کاملی از آنتی بیوتیک های تخریب شونده توسط آنزیم های مخرب تولید شده توسط سویه های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها می باشند، با استفاده از نوارهای E-Test تعیین شد. در ایزوله های بالینی *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* ۱۵ ایزوله (۲۲/۰۵ درصد) دارای حداقل غلظت مهاري بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر

برای جنتامایسین، ۱۰ ایزوله (۶/۸ درصد) دارای حداقل مهارتی بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۹ ایزوله (۵/۶ درصد) دارای حداقل غلظت مهارتی بیشتر از ۶۴ ایزوله و ۳ ایزوله (۴/۴ درصد) دارای حداقل غلظت مهارتی 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 تقریباً 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 مهارتی بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای جنتامایسین، ۸ ایزوله (۱۷/۷۷ درصد) دارای حداقل مهارتی بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای کانامایسین، ۳ ایزوله (۴/۴ درصد) دارای حداقل غلظت مهارتی بیشتر از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ ایزوله (۲/۲ درصد) دارای حداقل غلظت مهارتی 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 آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین بیش از ۶۰ درصد گزارش 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 مناطق 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

کاملاً 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 *استافیلوکوک‌ها* 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 بخش‌های 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 ایزوله (۴/۴ درصد) دارای ژن (*ant(4')* *-Ia1* بودند. ژن (*aac(6')* *Ie/aph(2')* با فراوانی بیش از ۱۵ درصد، بیش‌ترین شیوع را در بین *استافیلوکوک‌های ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوک*

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.

اپیدرمیدیس داشت. این افزایش فراوانی به دلیل حضور این ژن بر روی ترانسپوزون Tn4001 می باشد که سبب گردش این ژن در بین استافیلوکوک ها می شود. 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 هم خوانی داشت (۳۵-۳۷). از نظر ژنتیکی این ژن بر روی ترانسپوزون Tn4505 حمل می شود که ممکن است در کروموزوم یا پلاسمید قرار گرفته باشد. در کنار این دو ژن، ژن *ant(4')* *Ial* کمترین فراوانی را در دو گونه مورد بررسی داشت.

### نتیجه گیری

با توجه به مقطعی بودن این مطالعه و عدم دسترسی به نمونه های بیشتر و زمان طولانی تر نمی توان به قطعیت در مورد شیوع این ژن ها 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 می باشد. البته نباید از این مورد چشم پوشی کرد که مقاومت به متی سیلین و حضور ژن ها عامل مقاومت در این مطالعه به وفور دیده شد که ناشی از مصرف نادرست آنتی بیوتیک های بتالاکتامی می باشد. در نهایت باید با کنترل مصرف آنتی بیوتیک های بتالاکتامی در درمان عفونت های استافیلوکوکی، در کم کردن این مقاومت ها و ریشه کنی سویه های 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

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 aureus* 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

9. Xu Z, Mkrtychyan 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.

enzymes among methicillin-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

- 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-existence 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.