

دیگری مانند سرولوژی، کشت خون یا انجام PCR روی نمونه‌های خون هم به‌عنوان روش‌های مکمل استفاده شود.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

روش PCR ژنوم ارگانیزم مورد نظر ردیابی می‌شود و احتمال ردیابی ارگانیزم غیرفعال یا مرده نیز وجود دارد. اما روش کشت بر مبنای شناسایی ارگانیزم‌های زنده است. از این جهت پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اولاً نمونه‌برداری جمعیت یکسان باشد و نمونه‌برداری از جمعیت سالم نیز انجام شود. چرا که آمار داده شده در این تحقیق بر مبنای مراجعه و نمونه‌گیری زانی است که به‌علت بیماری به پزشک مراجعه کرده‌اند و ثانیاً علاوه بر روش PCR از روش‌های شناسایی

۶- منابع

- [1] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Listeria and Erysipelothrix*. *Man Clin Microbiol* 2003; 1: 461-9.
- [2] Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114(1-2): 1-15.
- [3] Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. *Int J Food Microbiol* 2008; 122(3): 336-40.
- [4] Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55: 645-59.
- [5] Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, Brandi G, Magnani M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Cont* 2007; 18: 1137-42.
- [6] Giono S, Perez Miravet A. Perinatal *Listeria* Infection In Mexico. I. Investigation of *Listeria monocytogenes* in the vaginal exudate. *Rev Inst Salubr Enferm Trop* 1963; 23: 95-101.
- [7] Lamont RJ, Postlethwaite R. Carriage of *Listeria monocytogenes* and related species in pregnant and non-pregnant women in Aberdeen, Scotland. *J Infect* 1986; 13(2): 187-93.
- [8] Stepanovich S, Vukovich D, Djukic S, Cirkovic I, Svabic-Vlahovic M. Long-term analysis of *Listeria monocytogenes* vaginal carriage frequency in Belgrade, Serbia (short communication). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2007; 54(2): 195-9.
- [9] Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol* 1992; 143(3): 271-80.
- [10] Aznar R, Alarcón B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J Appl Microbiol* 2003; 95(5): 958-66.
- [11] Shakuntala I, Malik SV, Barbuddhe SB, Rawool DB. Isolation of *Listeria monocytogenes* from

- buffaloes with reproductive disorders and its confirmation by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 2006; 117(2-4): 229-34.
- [12] Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scotti M, Esteve T, Vázquez-Boland JA, Pla M. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and ampliFluor technology. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(3): 1366-77.

بررسی شیوع ژن *ant(4')-Ia* در میان ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش Multiplex-PCR

عباس یادگار^۱، مرتضی ستاری^{۲*}، نورامیر مظفری^۳، غلامرضا گودرزی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۶

چکیده

هدف: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است. آمینوگلیکوزیدها عوامل باکتریسیدال قدرتمندی هستند که اغلب به صورت ترکیبی همراه با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها به خصوص در درمان اندوکاردیت استافیلوکوکی مصرف می‌شوند. غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو توسط آنزیم‌های سلولی تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در استافیلوکوک‌ها است.

هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن *ant(4')-Ia* کدکننده یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن *mecA* که موجب مقاومت به متی‌سیلین می‌شود، به‌طور همزمان به روش Multiplex-PCR در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۱۰۰ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان‌های شریعتی و بقیه‌الله تهران، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها به روش انتشار از دیسک توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین، اگزاسیلین، ونکومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، جنتامیسین، توبرامایسین، آمیکاسین، نتیل‌مایسین و کانامایسین با رعایت اصول CLSI تعیین شد. همچنین توسط روش رقیق‌سازی در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی با استفاده از پودر آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، جنتامیسین، توبرامایسین و آمیکاسین تعیین شد. برای تشخیص ژن‌های مقاومت *ant(4')-Ia* و *mecA* از دو جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد و با استفاده از روش Multiplex-PCR فراوانی آن‌ها تعیین شد.

نتایج: تمامی سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند (۱۰۰ درصد) و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در مقابل کانامایسین (۶۸ درصد)، تتراسایکلین (۶۱ درصد)، اریترومایسین (۵۶ درصد)، توبرامایسین (۵۳ درصد)، جنتامیسین (۵۲ درصد)، آمیکاسین و اگزاسیلین (۴۸ درصد) و نتیل‌مایسین (۲۲ درصد) مشاهده شد. همچنین تمامی سویه‌ها نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۱۰۰ درصد). در روش رقیق‌سازی در آگار ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و ۴۹ درصد، ۴۵ درصد و ۵۱ درصد سویه‌ها نیز به ترتیب نسبت به جنتامیسین، آمیکاسین و توبرامایسین مقاومت نشان دادند. همچنین ۳۷ درصد سویه‌ها مقاومت سطح بالا نسبت به جنتامیسین با حداقل غلظت مهارتی ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان دادند. در روش Multiplex-PCR ۵۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند و ۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن *ant(4')-Ia* مثبت بودند.

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۱۵۸-۱۴۱۱۵
Email: sattarim@modares.ac.ir

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده توسط آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهند که ارتباط معناداری از نظر آماری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین وجود دارد ($P < 0.05$).

کلیدواژگان: استافیلوکوکوس اورئوس، *mecA* مقاومت آمینوگلیکوزیدی، روش Multiplex-PCR

۱- مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) به روشنی به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها (Beta lactam)، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها (Tetracycline)، فلوروکوئینولون‌ها (Fluoroquinolones) و ماکرولیدها (Macrolides) کسب کرده است. بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین (Vancomycin) و تیکوپلانی (Teicoplanine) در دسترس هستند. مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها به دلیل تولید بیش از حد PBP2a است که یک پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin-Binding Protein: PBP) تغییر یافته است و تمایل کمی برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام نشان می‌دهد [۱-۴].

آمینوگلیکوزیدها اغلب به‌صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت باکتریایی که توسط انتروکوک‌ها (*Enterococcus*) و استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شود کاربرد دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به زیرواحد ریبوزومی ۳۰S باعث تداخل در سنتز پروتئین‌های سلول باکتری می‌شوند [۵]. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در گرم مثبت‌ها گزارش شده است. سه مکانیسم مقاومت

شامل تغییر در جایگاه ریبوزومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال‌سازی آنزیمی دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها هستند. در این میان غیرفعال‌سازی آنزیمی آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینو-گلیکوزیدها (Aminoglycoside-modifying enzymes: AMEs)، اصلی‌ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در گونه‌های استافیلوکوکی است. این آنزیم‌ها به سه رده مختلف براساس فعالیت تغییردهندگی شان طبقه‌بندی می‌شوند که شامل آمینوگلیکوزید استیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-acetyltransferases) AACs، آمینوگلیکوزید فسفریل ترانسفرازها (Aminoglycoside-phosphotransferases) و آمینوگلیکوزید نوکلئوتیدیل ترانسفرازها (Aminoglycoside-nucleotidyltransferases) ANTs هستند [۶-۹].

در میان کوکسی‌های گرم مثبتی چون استافیلوکوک‌ها، انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها (*Streptococcus*) پنج نوع از آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. از این میان سه آنزیم *ANT(4)-I*، *AAC(6)/APH(2)* و *APH(3)-III* که به ترتیب توسط ژن‌های *ant(4)-Ia*، *aac(6)-Ie/aph(2)* و *aph(3)-IIIa* کد می‌شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا آن‌ها جزء شایع‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده در گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌ها هستند و علاوه بر این باعث غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌شوند که از اهمیت درمانی و بالینی برخوردارند [۱۰-۱۳].

هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن *ant(4)-Ia* کدکننده یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها به همراه ژن *mecA* که موجب مقاومت به متی‌سیلین می‌شود، به‌طور همزمان به روش Multiplex-PCR در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی است. همچنین

(Gentamicin) (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (Amikacin) (۳۰ میکروگرم)، نتیل مایسین (Netilmicin) (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (Tobramycin) (۱۰ میکروگرم) و کانامایسین (Kanamycin) (۳۰ میکروگرم) مطابق روش انتشار از دیسک کربی-بائر (Kirby-Bauer Disk diffusion method) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Mast, UK) و با رعایت استانداردهای (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI بررسی شد [۱۵]. همچنین حداقل غلظت مهارتی (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، جنتامیسین، آمیکاسین و توبرامایسین به روش رقیق‌سازی در آگار (Agar dilution method) با استفاده از پودرهای آنتی‌بیوتیک‌های مذکور (Sigma, St Louis, USA) تعیین شد. به این صورت که محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) (Muller Hinton agar) حاوی رقت‌های متوالی از صفر تا بیش از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های فوق تهیه شد. سپس یک میکرولیتر از اینوکولوم (Inoculum) باکتریایی با غلظت نهایی 10^4 cfu/spot (Colony-forming unit/spot) به هر کدام از رقت‌ها به روش نقطه‌ای تلقیح شد. همچنین برای تعیین MIC برای اگزاسیلین محیط مولر هینتون حاوی ۲/۵ درصد کلرور سدیم (NaCl) تهیه شد [۱۵].

برای کنترل کیفی دیسک‌ها و پودرهای آنتی‌بیوتیک از سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 و انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 (*Enterococcus faecalis*) (موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران) استفاده شد. همچنین از سویه استافیلوکوکوس اورئوس MRSA 400 (تهیه شده از بانک میکروبی بیمارستان بوعلی تهران) مقاوم به اگزاسیلین برای کنترل مقاومت به اگزاسیلین و از سویه انتروکوکوس فکالیس JH2-2 (اهدایی از طرف جناب آقای دکتر محمد فیض آبادی، آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران) که علاوه بر مقاومت نسبت

الگوهای مقاومتی به دست آمده نسبت به آمینوگلیکوزیدها و متی‌سیلین توسط روش‌های استاندارد تعیین حساسیت ضد میکروبی نظیر انتشار از دیسک و روش رقت در آگار با نتایج حاصل از روش مولکولی PCR مقایسه و بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و تشخیص باکتری‌ها

صد سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی مختلف نظیر زخم، آبسه، خلط، خون، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل از دو بیمارستان شریعتی و بقیه‌الله در تهران طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ به روش تصادفی جمع‌آوری شد. تمامی سویه‌ها ابتدا روی محیط مانیتول نمک آگار (Manitol Salt agar) تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کشت داده شدند و سپس برای تعیین هویت سویه‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی معمول نظیر آزمایش کاتالاز، کوآگولاز (Coagulase) و DNase برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد [۱۴]. در تمام آزمایش‌های باکتری‌شناسی از دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 (*Staphylococcus epidermis*) موجود در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان سویه‌های کنترل استفاده شد. در نهایت از تمامی سویه‌ها در محیط تریپتیک سوی برات (Tryptic Soy Broth: TSB) تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حاوی ۱۵ درصد گلیسرول استوک (Glycerol stock) کشت ذخیره تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها

برای تعیین الگوی مقاومتی سویه‌ها، حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین (Oxacillin) (۱ میکروگرم)، پنی‌سیلین G (۱۰ واحد)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (Erythromycin) (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و آمینوگلیکوزیدها شامل جنتامیسین

mecA و *ant(4')-Ia* و انتروکوکوس فکالیس JH2-2 (دارای ژن *ant(4')-Ia*) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده به همراه اندازه قطعات محصول PCR

مرجع	**	*	توالی	ژن
۱۳	۳۱۴	۱۷	جلویی ۵'-CCTAGTAAAGCTCCGGAA-۳	<i>mecA</i>
		۱۸	برگشتی ۵'-CTAGTCCATTCCGGTCCA-۳	
۱۳	۱۳۵	۱۷	جلویی ۵'-AATCGGTAGAAGCCCAA-۳	<i>ant(4')-Ia</i>
		۱۶	برگشتی ۵'-GCACCTGCCATTGCTA-۳	

* تعداد نوکلئوتید

** طول قطعه محصول (جفت باز)

محصولات PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز (وزنی به حجمی: W/V) حاوی ۰/۵ میکرولیتر در میلی لیتر اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) از یکدیگر جدا شدند و سپس در زیر نور ماورای بنفش (Ultra violet: UV) در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور (Transilluminator) مشاهده شدند. برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگر (Marker) مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (GeneRuler™, Fermentas) استفاده شد. در نهایت از ژل حاصل توسط دستگاه ژل داکی (BioDocAnalyse, Biometra) عکس برداری شد.

۲-۵- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵ برنامه ویندوز) و نرم افزار Excel 2007 (Microsoft Office) و آزمون آماری χ^2 انجام گرفت و $P\text{-value} < 0/05$ از نظر آماری با اهمیت و معنی دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها نسبت به پنی سیلین مقاومت (۱۰۰ درصد) دارند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت به ترتیب

به ریغامپیسین (Rifampicin) و فوزیدیک اسید (Fusidic acid) نسبت به آمینوگلیکوزیدها نیز مقاوم است، برای کنترل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها استفاده شد.

۲-۳- استخراج ژنوم

برای استخراج DNA از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از کیت‌های استخراج DNA (DNPTM Kit) تهیه شده از شرکت CinnaGen استفاده شد. همچنین برای تخلیص بهتر و بیشتر DNA از آنزیم لیزواستافین (Lysostaphin) (Sigma, St Louis, USA) نیز استفاده شد.

۲-۴- واکنش Multiplex-PCR

برای تکثیر ژن‌های *ant(4')-Ia* و *mecA* از دو جفت آغازگر (Primer) اختصاصی که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی (Choi) و همکاران طراحی شد، استفاده گردید [۱۳]. توالی آغازگرها و اندازه قطعات محصول در جدول ۱ آمده است. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکرومول از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 1x، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مول dNTPs، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱/۵ واحد آنزیم *Taq DNA polymerase* (CinnaGen) بود که حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر (Mastecycler gradient, Eppendorf, Germany) نیز به این صورت تنظیم شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه و بعد از آن ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه.

در واکنش‌های PCR از DNA الگو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل منفی و سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس MRSA 400 (دارای ژن‌های

جدول ۳ ارتباط بین حضور ژن‌های *ant(4)-Ia* و *mecA* با فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی

فنوتیپ مقاومت a	<i>ant(4)-Ia</i>	<i>mecA</i>
K, TN, N, AK, GM	+	+
K, TN, AK, GM	+	+
K, TN, N, GM	+	+
K, TN, GM	+	+
K, TN, AK	+	+
K, TN	+	-
K	-	+
TN	-	-
K	-	-

(+): حضور ژن

(-): عدم حضور ژن

در جدول ۳ ارتباط بین حضور ژن‌های *mecA* و *ant(4)-Ia* و فنوتیپ‌های مختلف مقاومت آمینوگلیکوزیدی در سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده می‌شود. در جدول ۴ نیز درصد فراوانی ژن *ant(4)-Ia* و ژن *mecA* تعیین شده به روش Multiplex-PCR با مقاومت به متی‌سیلین به روش رقیق‌سازی در آگار مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ژن *ant(4)-Ia* در ۸۸ درصد سویه‌های MRSA وجود دارد در حالی که ۲۸ درصد سویه‌های MSSA از نظر حضور این ژن مثبت بودند.

جدول ۴ مقایسه فراوانی ژن *ant(4)-Ia* و ژن *mecA* با مقاومت به متی‌سیلین به روش رقیق‌سازی در آگار

نوع ژن مقاومت	نوع نمونه برحسب تعداد (درصد)		جمع کل (درصد)
	MSSA: ۵۰ (درصد)	MRSA: ۵۰ (درصد)	
<i>ant(4)-Ia</i>	۱۴ (۲۸)	۴۴ (۸۸)	۵۸ (۵۸)
<i>mecA</i>	۴ (۸)	۴۹ (۹۸)	۵۳ (۵۳)

۴- بحث

مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس اکتساب ژن کدکننده یک آنزیم ترانس‌پپتیداز (PBP) جدید است که تمایل کاهش‌یافته‌ای برای اتصال به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. ژن کدکننده مقاومت به

متی‌سیلین *mecA* است که این ژن روی کروموزوم سویه‌های MRSA حمل می‌شود. این ژن یک PBP تغییر یافته و با تمایل کم برای اتصال به بتالاکتام‌ها به نام PBP2a یا PBP2' را کد می‌کند. ژن *mecA* بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام کاست کروموزومی استافیلوکوکی *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*: SCC*mec*) است [۱۶-۲۰]. از آنجا که ژن *mecA* هومولوژی سطح بالایی در میان سویه‌های MRSA و استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci: MRCNS) دارد؛ بنابراین این ژن به‌عنوان یک شاخص مولکولی مناسب برای تعیین مقاومت به متی‌سیلین در تمام گونه‌های استافیلوکوکی توصیف شده است [۲۱، ۲۲].

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت‌های جدی استافیلوکوکی با ارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌ها بازی می‌کنند. این آنتی‌بیوتیک‌ها از ویژگی‌های متعددی برخوردارند و به‌همین دلیل از آن‌ها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی مفید و با ارزش یاد می‌کنند. از میان این ویژگی‌ها می‌توان به فعالیت باکتری‌سیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی‌بیوتیک (Post-antibiotic effect: PAE) و آثار هم‌افزایی آن‌ها با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها همچون بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد [۲۳-۲۶]. معمول‌ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در استافیلوکوک‌ها تغییر و اصلاح آن‌ها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها است به‌صورتی که این آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم نیستند. ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها یا روی پلاسمیدها (پلاسمیدهای مقاومت به جنتامیسین، نئومایسین (Neomycin) و کانامایسین) یا روی کروموزوم قرار دارند [۲۷-۳۰].

میزان مقاومت در برابر اگراسیلین در آزمایش تعیین MIC به روش رقیق‌سازی در آگار دو درصد بیشتر از آزمایش انتشار

بودند [۱۲]. مقاومت به نئوماکسیمین، تورامایسین، آمیکاسین، جنتامیسین و کانامایسین در استافیلوکوک‌ها توسط آنزیم ANT(4')-I که به‌وسیله ژن *ant(4')-Ia* کد می‌شود واسطه‌گری می‌شود. این ژن اغلب روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگاتیوی (Conjugative) مانند pSK41 و در نهایت درون منطقه *mec* از کروموزوم سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که احتمالاً نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه‌گری شده توسط IS257-mediated recombination events (IS257) است، الحاق می‌شوند [۳۱]. پلاسمید pUB110 که ژن *ant(4')-Ia* را حمل می‌کند درون SCCmec II الحاق شده است، همچنین پلاسمیدهای الحاقی حمل‌کننده ترانسپوزون Tn4001 (Transposone) که کدکننده ژن *aac(6')-Ia* هستند در SCCmec IVc گزارش شده‌اند [۳۲]. مطالعات متعددی ارتباط بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و مقاومت به متی‌سیلین را نشان داده‌اند [۱۲، ۱۳، ۲۱، ۳۳]. در این مطالعه نیز ارتباط آشکاری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده شد.

ژن *ant(4')-Ia* در ۸۸ درصد سویه‌های MRSA مشاهده شد در حالی که ۲۸ درصد سویه‌های MSSA از نظر حضور این ژن مثبت بودند. همچنین از نظر آماری ارتباط معناداری بین حضور ژن *ant(4')-Ia* و مقاومت به آمیکاسین مشاهده شد ($P\text{-value} < 0/05$). تعداد معدودی از سویه‌ها در روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به تورامایسین و کانامایسین مقاومت نشان دادند؛ در حالی که فاقد ژن *ant(4')-Ia* بودند. در چنین مواردی احتمالاً مقاومت به دلیل حضور دیگر ژن‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی یا مکانیسم‌های دیگری همچون کاهش نفوذپذیری دارو یا تغییر اهداف ریبوزومی است.

نتایج مطالعات انجام شده در سایر کشورها نشان داد که ژن *aac(6')-Ie/aph(2'')* فراوان‌ترین ژن کدکننده آنزیم‌های AME

از دیسک (۵۰ درصد در مقابل ۴۸ درصد) است. در خصوص آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی میزان مقاومت در آزمایش تعیین MIC به روش رقیق‌سازی در آگار به‌طور کلی کمتر از نتایج آزمایش انتشار از دیسک است. تمامی سویه‌های با فنوتیپ HLGR ($MIC \leq 128$ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به آگراسیلین مقاومت نشان دادند و به‌طور کلی در سویه‌های MRSA در مقایسه با سویه‌های MSSA مقاومت بالاتری نسبت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده می‌شود. از نظر آماری نیز ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مشاهده می‌شود ($P\text{-value} < 0/05$).

در مطالعه حاضر ۵۳ درصد سویه‌ها از نظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند در حالی که در روش‌های فنوتیپی انتشار از دیسک و رقیق‌سازی در آگار به‌ترتیب ۴۸ درصد و ۵۰ درصد سویه‌ها نسبت به آگراسیلین مقاومت نشان دادند. از بین ۵۳ سویه *mecA*⁺ چهار سویه در روش رقیق‌سازی در آگار نسبت به آگراسیلین حساسیت نشان دادند. در چنین مواردی که سویه *mecA*⁺ بوده ولی در روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت نسبت به آگراسیلین حساس است علت این است که ژن *mecA* به‌طور دائم بیان نمی‌شود و ژن‌های جانبی ویژه‌ای همچون ژن *femA* و *mecR* ممکن است در بیان آن نقش داشته باشند یا این که ژن سرکوب‌شده *mecA* به روش PCR تکثیر شود [۱۶]. همچنین از بین ۴۷ سویه *mecA*⁻ یک سویه در روش رقیق‌سازی در آگار به آگراسیلین مقاوم بود. در چنین مواردی مقاومت به تولید بیش از حد آنزیم بتالاکتاماز یا وجود PBP دیگری به غیر از PBP2a یا PBP2² که توسط ژنی غیر از ژن *mecA* کد می‌شوند، نسبت داده می‌شود [۱۶]. با وجود چنین اختلافات جزئی امروزه از روش PCR به‌عنوان استاندارد طلایی در تشخیص سویه‌های MRSA نام برده می‌شود [۲۱].

۵۸ درصد سویه‌ها نیز از نظر حضور ژن *ant(4')-Ia* مثبت بودند. یکی از دلایل بالا بودن شیوع ژن *ant(4')-Ia* در این مطالعه این است که این ژن در نزدیکی ژن *mecA* قرار دارد و در این مطالعه نیز ۵۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA*

روی سویه‌های MRSA بررسی و گزارش کرده‌اند؛ در حالی که در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس اعم از MRSA و MSSA بررسی شد.

با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها و افزایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، تشخیص سریع و به‌موقع سویه‌های مقاوم به‌منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به‌نظر می‌رسد. همان‌طور که اشاره شد مطالعات مختلفی ارتباط بین مقاومت به متی‌سیلین و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را در سویه‌های MRSA تأیید می‌کنند. در مطالعه حاضر نیز چنین ارتباطی به وضوح مشاهده می‌شود. بنابراین شناسایی سریع و همزمان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های AME به همراه ژن *mecA* با استفاده از روش Multiplex-PCR از مزیت‌های ویژه‌ای برخوردار است، زیرا با استفاده از این روش که تکنیکی سریع و قابل اعتماد است، می‌توان چندین ژن مقاومت را به‌طور همزمان طی یک واکنش و در کمتر از ۶ ساعت شناسایی کرد.

۵- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته باکتری‌شناسی پزشکی انجام شده است. همچنین بدین وسیله از استاد گرامی جناب آقای دکتر محمدمهدی فیض‌آبادی به دلیل اهدای سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس JH2-2 تشکر و قدردانی می‌شود.

در سویه‌های بالینی MRSA در کشورهای اروپایی است [۱۲، ۲۱]. همچنین طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط چوی و همکاران در کره انجام شد نتایج مشابهی به‌دست آمد به این صورت که ژن *aac(6)-Ie/aph(2'')* با فراوانی ۶۵ درصد شایع‌ترین ژن در میان ایزوله‌های مورد مطالعه بوده و بعد از آن ژن‌های *ant(4)-Ia* و *aph(3')-IIIa* به‌ترتیب با فراوانی ۴۱ درصد و ۹ درصد شناسایی شدند [۱۳]. در سال ۲۰۰۱ ایدا (Ida) و همکاران طی تحقیقی که در ژاپن انجام دادند نتایجی متفاوت با آنچه که در کشورهای اروپایی به‌دست آمده بود، گرفتند. در این بررسی ژن *ant(4)-Ia* با فراوانی ۸۴/۵ درصد بیشترین شیوع را داشت و ژن‌های *aac(6)-Ie/aph(2'')* و *aph(3')-IIIa* هر کدام به‌ترتیب با فراوانی ۶۱/۷ درصد و ۸/۹ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند [۱۲].

طی مطالعه‌ای که توسط فتح‌اله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در داخل کشور انجام شد، میزان مقاومت ۱۰۹ ایزوله MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به روش انتشار از دیسک بررسی شد. در این مطالعه ۹۷ درصد سویه‌ها مقاوم به کانامایسین، ۹۶ درصد مقاوم به توبرامایسین، ۸۷ درصد مقاوم به جنتامایسین، ۹۳ درصد مقاوم به آمیکاسین و ۸۰ درصد مقاوم به نتیل‌مایسین گزارش شدند. همچنین در این بررسی با استفاده از روش PCR فراوانی ژن‌های AME تعیین و به این صورت گزارش شد که ژن *aac(6)-Ie/aph(2'')* با فراوانی ۸۳ درصد دارای بیشترین شیوع و پس از آن ژن‌های *aph(3')-IIIa* و *ant(4)-Ia* هر کدام به‌ترتیب با فراوانی ۷۱ و ۲۶ درصد در کل ایزوله‌ها شناسایی شدند [۳۴]. یکی از دلایل اصلی بالا بودن سطح مقاومت در این بررسی نسبت به مطالعه حاضر این است که این محققان مقاومت آمینوگلیکوزیدی را تنها

۶- منابع

- [1] Novick PR, Schelievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect* 2001; 3(7): 585-94.
- [2] Konno M. Nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Infect Chemother* 1995; 1(1): 30-9.

- [3] Warsa CW, Okubo T, Okamoto R. Antimicrobial susceptibilities and phage typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Indonesia. *J Infect Chemother* 1996; 2: 29-33.
- [4] Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003; 111(9): 1265-73.
- [5] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 430-50.
- [6] Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1003-12.
- [7] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 727-37.
- [8] Arya DP. Aminoglycoside Antibiotics, From Chemical Biology to Drug Discovery. John Wiley & Sons, Inc.; USA: 2007; p: 119-40.
- [9] Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Taber H. Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2nd ed; CRC Press; USA: 2008; p: 71-101.
- [10] Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 836-71.
- [11] Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. Belgian Study Group of Hospital Infections (GDEPIH/GOSPIZ). *J Med Microbiol* 1994; 41(4): 282-90.
- [12] 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.
- [13] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, Kang JH, Shin WS, Kang MW. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci* 2003; 18(5): 631-6.
- [14] Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Diagnostic Microbiology. 18th ed; Mosby Press; Philadelphia, USA: 1990; p: 323-32.
- [15] Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S17. CLSI, 2007.
- [16] Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; 97(3): 339-44.
- [17] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9(10): 486-93.
- [18] Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7(5): 563-9.
- [19] Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 2003; 6(1): 41-52.

- [20] Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 1987; 51(1): 88-134.
- [21] Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol Res* 2006; 161(1): 49-54.
- [22] Martins A, Cunha Mde L. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 2007; 51(9): 787-95.
- [23] Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10(2): 95-105.
- [24] Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(11): 2977-86.
- [25] Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycin-gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(6): 1534-5.
- [26] Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol* 2008; 56(6): 558-62.
- [27] Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(5): 499-503.
- [28] Brown NM, Reeves DS. Mechanisms and epidemiology of aminoglycoside resistance. *J Med Microbiol* 1992; 36: 11-4.
- [29] 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(1): 138-63.
- [30] Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(11): 2164-8.
- [31] Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 1994; 31(1): 12-20.
- [32] Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4',4" adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. *Plasmid* 1991; 25(1): 70-5.
- [33] Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resist* 2009; 15(2): (ARTICLE IN PRESS).
- [34] Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, Jabalameli F. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(3): 264-5.