

ردیابی مولکولی ژن‌های *smr* و *qacA/B* در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴

حامد طهماسبی^{۱*}، محمد بکائیان^۲

۱. دانشجوی کارشناس‌ارشد باکتری‌شناسی، گروه میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران
 ۲. دانشیار، متخصص باکتری‌شناسی پزشکی، گروه میکروپزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، عضو مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری زاهدان، زاهدان، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۳۱ فروردین ۱۳۹۵
 تاریخ پذیرش: ۹ تیر ۱۳۹۵

اهداف مواد ضد عفونی‌کننده و آنتی‌سپتیک‌ها از گذشته برای ضد عفونی کردن وسایل و سطوح استفاده می‌شده است. در برخی موارد این مواد به واسطه یک سری پروتئین‌های خاصی بی‌اثر می‌شوند که در باکتری‌ها حضور دارند. از مهم‌ترین ژن‌های به‌وجودآورنده این امر می‌توان به *smr* و *qacA/B* اشاره کرد که در برخی موارد در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) دیده می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی ژن‌های *qacA/B* و *smr* در سویه‌های MRSA است.

مواد و روش‌ها هشتادونه ایزوله از نمونه‌های بالینی مختلف (خون، ادرار، کاتتر، زخم، ترشحات و سایر) به واسطه تست بیوشیمیایی اولیه جداسازی شد. غربالگری اولیه برای مقاومت به متی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) انجام شد. بعد از آن با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ردیابی ژن‌های *16sRNA*، *smr* و *qacA/B* انجام گرفت. در نهایت، با استفاده از آزمون آماری کای دو نتایج به‌دست‌آمده بررسی شد.

یافته‌ها از مجموع ۸۹ ایزوله جدا سازی شده، ۵۹ ایزوله با آزمون‌های اولیه فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین شناخته شد. از این میان ۵۰ ایزوله (۸۴/۷۴ درصد) دارای ژن *mecA* ۱۴ ایزوله (۲۳/۷۳ درصد) دارای ژن *smr* و ۲۹ ایزوله (۴۹/۱۵ درصد) دارای ژن *qacA/B* بود. با استفاده از آزمون‌های آماری و با توجه به p value به‌دست‌آمده، ارتباط معناداری بین ژن‌های *qacA/B* و *mecA* به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از شیوع ژن‌های مورد مطالعه در شهر زاهدان و بالابودن فراوانی سویه‌های MRSA، باید با دقت بیشتری به استفاده از مواد ضد عفونی‌کننده پرداخت. به‌دلیل حضور نمونه‌های مقاوم به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی جدا شده، باید از غلظت مؤثر برای ضد عفونی سطوح و وسایل پزشکی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها:

استافیلوکوک اورئوس، ژن *mecA*، ژن *qacA/B*، ژن *smr*

مقدمه

خروج مواد سمی راه‌یافته به باکتری‌ها مانند آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی و ضد عفونی‌کننده‌ها می‌شود [۳]. حضور مستمر در برابر مواد سمی ژن‌های کدکننده این کانال‌ها را فعال و در نهایت باکتری را در مقابل آن‌ها مقاوم می‌کند [۴]. تعدادی از این ژن‌های مولد افلاکس پمپ‌ها در استافیلوکوکوس‌ها از جمله استافیلوکوک اورئوس شناسایی شده است. *aqc*ها از جمله پروتئین‌های ترشحی استافیلوکوک

پمپ‌های ترشحی چند دارویی پروتئین‌هایی در سطح غشای باکتری‌ها و معمولاً دارای چند کانال انتقالی برای جابه‌جا کردن مواد سمی به خارج از سلول است [۱]. بسترهای آن ممکن است بر اساس کاتیون‌ها، ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیم (*qac*) و مشتقات فسفونیم شکل بگیرد [۲]. این افلاکس پمپ‌ها ویژگی‌ای محافظتی برای باکتری به‌وجود می‌آورد که سبب

* نویسنده مسئول: حامد طهماسبی

نشانی: دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروپزشکی
 تلفن: ۰۹۱۸۳۱۹۵۶۴۵

رایانه: h.tahmasebi87@yahoo.com

افزایش ایجاد مقاومت در سویه های MRSA به عوا مل ضد عفونی کننده گزارش شده است و در سال ۱۹۹۰ اولین مورد از این سویه گزارش شد که مقاومت به ضد عفونی کننده ها را پیدا کرده بود [۱۶-۱۸]. ژن های *smr*، *qac A* و *qac B* که غالباً روی پلاسمید حمل می شود، معمولاً به دلیل این ویژگی خود، قدرت انتقال بالایی پیدا کرده است. این مطالعه با هدف ردیابی ژن های *qacA*، *qacB* و *smr* و مشخص کردن شیوع باکتری های مقاوم به ضد عفونی کننده ها، در ایزوله های بالینی / ستافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیمارستان های آموزشی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری و شناسایی ایزوله های باکتریایی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، طی دوره ای شش ماهه، ۳۴۹ نمونه باکتریایی از بیماران بستری در بخش های مختلف مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در سال ۱۳۹۴ جمع آوری شد، شامل نمونه های خون، ادرار، زخم، ترشحات، آسسه، سواب و، کاتتر و سایر. بعد از کشت اولیه، نمونه های جمع آوری شده داخل میکروتیوب های پلاستیکی در دار و حاوی محیط ترانسپورت BHI (Merck آلمان) با ۱۰ درصد گلیسرول تلقیح و برای انجام آزمایش های تکمیلی و تشخیصی دقیق تر به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شد. تا زمان انجام آزمایش ها، نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه های به دست آمده روی محیط Blood Agar (Merck آلمان) پایه که به ۵ درصد خون تازه گوسفندی غنی شده بود، به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از مشاهده کلنی ها، رنگ آمیزی گرم انجام و کوکسی های گرم مثبت جداسازی شد.

برای اینکه بتوان استافیلوکوک ها را از استرپتوکوک ها تفریق داد، از تست کاتالاز با استفاده از کیت ZB-CAT (ZellBio آلمان) استفاده شد. برای تشخیص استافیلوکوک ها از میکروکوک ها هم از آزمایش اکسیسایش و احیا Oxidation (OF) and fermentation test استفاده شد. برای تفکیک استافیلوکوک های کوگولاز مثبت از استافیلوکوک های کوگولاز منفی از تست کوگولاز لوله ای (با استفاده از کیت Tadbirkkit ایران) استفاده شد. در نهایت، ۸۹ ایزوله استافیلوکوک اورئوس بعد از انجام آزمایش های افتراقی از مجموع ۳۴۹ نمونه جمع آوری شده به دست آمد. برای تأیید ایزوله های استافیلوکوک اورئوس به دست آمده از ژن *16SrRNA* استفاده شد.

اورئوس است که به دو خانواده پروتئینی Major Facilitator Superfamily (MFS) و Small Multidrug Resistance (SMR) تقسیم می شود [۵]. ژن های *qacA/B* و *smr* از جمله ژن هایی است که مقاومت به کلرگزیدین و آنتیموآن های چند ظرفیتی را سبب می شود. ژن های دیگری از جمله *qac J* و *qac H* و *qac G* هم در گروه *qac* در / ستافیلوکوک ها مطالعه شده است که از نمونه های دامی و مواد غذایی- لبنی جداسازی شده است [۵]. کلرگزیدین از جمله ضد عفونی کننده هایی است که از سال ۱۹۴۵ برای ضد عفونی کاتترها و ضد عفونی سطوح استفاده می شود [۲].

در برخی مطالعات، ظهور ژن های عامل مقاومت *qac* همراه با ژن های کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک های جنتامیسین، تری متوپریم، پنی سیلین، کانامایسین و توبرامایسین روی عناصر ژنتیکی متحرک یافت شده است [۶، ۷]. در امر ضد عفونی سطوح و وسایل پزشکی و جلوگیری از انتشار آلودگی های باکتریایی، از ضد عفونی های چهار ظرفیتی آمونیم (qacs) مانند ستیل پری دینیم کلراید، بنزالکونیم کراید، ستریماید، پروسین و دتی زور در بیمارستان ها استفاده می شود [۸]. بالابودن فراوانی باکتری / ستافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) در محیط های بیمارستانی و استفاده گسترده از شوینده های مختلف در ضد عفونی سطوح و ابزارهای پزشکی، سبب پیداشدن سویه های جدیدی شد که حامل ژن های مقاومت به مواد ضد عفونی کننده است [۹]. سویه های MRSA را نخستین بار در سال ۱۹۵۰ در کشور آمریکا شناسایی و گزارش کردند. از سال ۱۹۸۰ در بیشتر بیمارستان های دنیا به صورت اندمیک درآمد [۱۰ و ۱۱].

سازوکار اصلی مقاومت به متی سیلین در / ستافیلوکوک اورئوس مربوط به تولید پروتئینی به نام PBP2 است که میل ترکیبی کمی با بتا لاکتام ها دارد و سبب مقاومت به بتا لاکتام ها می شود [۱۲]. PBP4 و PBP2A انواع دیگری از PBP است. به دلیل اهمیت PBP2 در ایجاد مقاومت به متی سیلین، به این پروتئین بیشتر پرداخته می شود. تولید این پروتئین با ژن های *mec* موجود روی کروموزوم باکتری مرتبط است [۱۳].

در ایزوله های / ستافیلوکوک اورئوس می توان برای تأیید مولکولی از ژن *16SrRNA* استفاده کرد. علاوه بر این، حضور ژن *mecA* به بروز / ستافیلوکوک اورئوس های مقاوم به متی سیلین کمک می کند [۱۴]. تصور بر آن است که گسترش وسیع در مصرف QACs ممکن است موجب فشار انتخابی شود و در پیدایش میکروارگانیزم های مقاوم به این مواد در محیط های کلینیکی دخیل باشد [۱۵]. در برخی مطالعات،

به ۵ میلی لیتر محیط کشت LB Btoth (Merck آلمان) تلقیح شد که قبلاً درون لوله های دردار شیشه ایی به تعداد ایزوله ها تقسیم و شمارگی گذاری شده بود و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ساعت انکوبه شد. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های دردار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج سینا ژن ایران (Cat. No.PR881614) بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای انجام آزمون های مولکولی ذخیره شد.

ب) آماده سازی پرایمرها

پرایمرهای تهیه شده از شرکت ماکروژن به سفارش شرکت پیشگام ایران، بعد اضافه کردن حجم مورد نظر آب مقطر به رقت اولیه ۱۰۰ پیکومولار رسانده شد. از پرایمرهای forward و reverse رقت ۲۰ پیکومولار تهیه شد. بعد از قراردادن پرایمرها در دمای ۴+ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت، رقت های استوک برای انجام آزمایش های بعدی تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شد. در این روند، از پرایمرهای جدول ۱ برای تکثیر ژن های *smr* و *mecA*، *qacA/B* در نمونه های مورد نظر استفاده شد.

ج) واکنش PCR

برای انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس 2x Tris- and 1.5 mM MgCl₂ (شرکت Ampliqon آلمان) شامل 0.2% Tween 20، 3 mM Mgcl₂، (NH₄) SO₄، Hcl pH 8.5 Insert red unit Ampliqon polymeras 0/2، MmdNTP 4/4 dye and stabilizer استفاده شد. برای رساندن به حجم نهایی آب مقطر دیونیزه به کار رفت. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو برای کنترل منفی استفاده شد [۱۴]. آزمون PCR برای ژن ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Corbett CGI-96 (ساخت کشور آمریکا) طبق الگوی جدول ۲ تنظیم شد [۱۴].

تعیین فنوتیپی سویه های مقاوم به متی سیلین به روش دیسک دیفیوژن

برای تعیین سویه های مقاوم به متی سیلین از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد، به طوری که نخست محلول نیم مک فارلند از کلنی های تعیین هویت شده تهیه شد. بعد از کشت در محیط Mueller Hinton agar (Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی متر، دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم و اوگزا سیلین ۱ میکروگرم (هر دو انگلستان) با پنس استریل روی محیط قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بر اساس جدیدترین معیار CLSI 2015، در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک سفوکسیتین بیش از ۲۱ میلی متر باشد، استافیلوکوک اورئوس حساس به سفوکسیتین در نظر گرفته می شود. در صورتی که قطر هاله نسبت به دیسک سفوکسیتین کمتر از ۲۱ میلی متر باشد، ایزوله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به سفوکسیتین و در صورتی که قطر هاله ایجاد شده نسبت به دیسک اوگزا سیلین بیش از ۲۱ میلی متر باشد، استافیلوکوک اورئوس حساس به اوگزا سیلین در نظر گرفته می شود [۲۷]. در این مطالعه از سویه استافیلوکوک اورئوس ATCC33591 برای سویه استاندارد کنترل مثبت و از سویه استاندارد استافیلوکوک اورئوس ATCC25923 برای کنترل منفی استفاده شد [۲۸]. این سویه های استاندارد از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران و ایزوله های استاندارد ذخیره شده در بانک باکتریایی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تهیه شد.

آزمایش های مولکولی در تعیین ژن های *smr*، *qacA/B* و *mecA* در ایزوله های استافیلوکوک اورئوس

الف) استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA ژنومی، مراحل اولیه به صورت زیر انجام شد. نخست، ایزوله های بالینی تأیید شده با آزمایش های بیوشیمیایی ذخیره شده در ۲۰- درجه سانتی گراد روی محیط Blood agar (Merck آلمان) با ۵ در صد خون گوسفند، ساب کالچر داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس، یک کلنی از هر ایزوله کشت داده شده

جدول ۱. فهرست پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای شناسایی تکثیر ژن های *smr* و *mecA*، *qacA/B*

ژن های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (bp)	منبع
qacA/B	qacA/B F qacA/B R	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	۱۵۷	راگی و همکاران [۱۹]
mecA	mecA-F mecA-R	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	۵۳۳	نهایی و همکاران [۲۰]
smr	smr F smr R	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	۱۹۵	نوقاجی و همکاران [۲۱]
16sRNA	Staph756F Staph750R	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA CCACCTTCTCCGGTTTGTCACC	۷۵۰	مک کلور و همکاران [۲۹]

جدول ۲. تنظیمات ترموسایکلر در تکثیر ژن‌های *qacA/B smr* و *mecA* و *16SrRNA* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*

ژن	مراحل	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
<i>qacA/B</i>	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
	جفت‌شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طول‌شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
<i>mecA</i>	طول‌شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱
	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۳۰	
	جفت‌شدن پرایمرها	۵۵	۳۰	۳۰
<i>smr</i>	طول‌شدن پرایمرها	۷۲	۳۰	
	طول‌شدن نهایی	۷۲	۱۸۰	۱
	شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
	جداشدن قطعات DNA	۹۴	۴۰	
<i>smr</i>	جفت‌شدن پرایمرها	۵۴	۴۰	۲۵
	طول‌شدن پرایمرها	۷۲	۴۰	
	طول‌شدن نهایی	۷۲	۱۵۰	۱

الکتروفورز روی ژل اگارز ۱ درصد

پنج میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل اگارز ۱ درصد در بافر $\times 0.5$ الکتروفورز و برای مشاهده باندها استفاده شد. هنگام تهیه ژل به آن ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (Biotium آمریکا) اضافه شد. نتیجه نهایی با دستگاه Gel Documentation system CCD (Kiagen-biotech CCD-Tab1 ایران) بررسی و از آن عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰ bp فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باند مورد نظر استفاده شد. آزمون PCR به‌عنوان گلداستاندارد در مقایسه با سایر نتایج استفاده شد.

آنالیزهای آماری

در مطالعه حاضر، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ داده‌های به‌دست‌آمده بررسی و تجزیه و تحلیل آماری شد. 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 استفاده شد. در این مطالعه مقادیر p value در ژن‌های مختلف به‌دست آمد (مقدار $p \leq 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد).

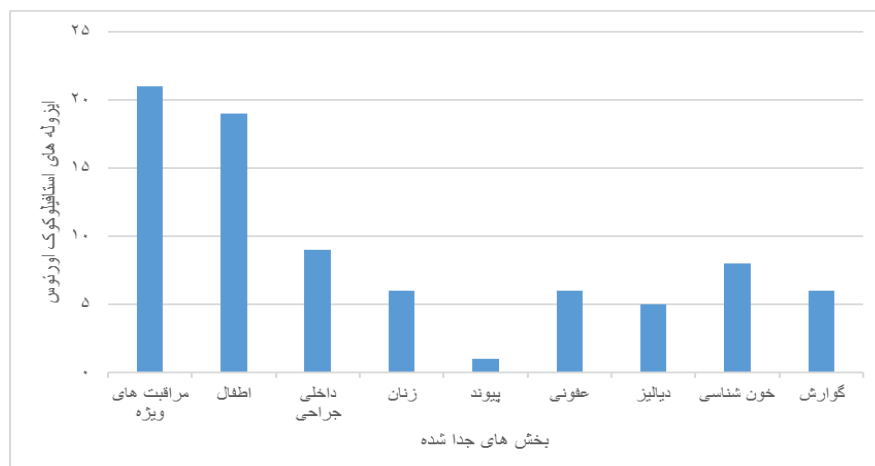
یافته‌ها

در مطالعه حاضر، بیشترین سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مربوط به نمونه‌های گرفته شده از بیماران بستری در بخش‌های اطفال و ICU جداسازی شد (شکل ۱). از ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* به‌دست‌آمده ۵۹ ایزوله به روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و اوگزا‌سیلین (۱ میکروگرم) مقاوم به متی‌سیلین و ۳۰ ایزوله

حساس به متی‌سیلین شناخته شد (جدول ۳). با بررسی‌های مولکولی ایزوله‌های غربالگری‌شده، ۵۰ ایزوله دارای ژن *mecA* بود (شکل ۲). ایزوله‌های جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های سوآپ بینی و ادرار بیشترین فراوانی را از نظر حضور ژن *mecA* داشت. همچنین، نمونه‌های ادرار، خون و سوآپ بینی از نظر ژن‌های *qacA/B* و *smr* بیشترین فراوانی را داشت. کمترین فراوانی در بین نمونه‌های به‌دست‌آمده از نظر حضور ژن‌های مورد مطالعه به نمونه‌های مایع مغزی-نخاعی و خلط اختصاص داشت (جدول ۴).

برای بالابردن ضریب حساسیت در تشخیص ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*، از ژن *16srRNA* استفاده شد. از ۸۹ ایزوله تأییدشده به روش‌های بیوشیمیایی و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی، همه ایزوله‌ها این ژن را داشتند. برای پی‌بردن به ارتباط یا عدم ارتباط حضور ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین و ژن‌های عامل مقاومت به بیوساید، بعد از تعیین هویت ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس*، حضور ژن‌های *smr* و *qacA/B* بررسی (شکل ۲، ۳ و ۴) و با استفاده از آنالیزهای آماری ارزیابی شد.

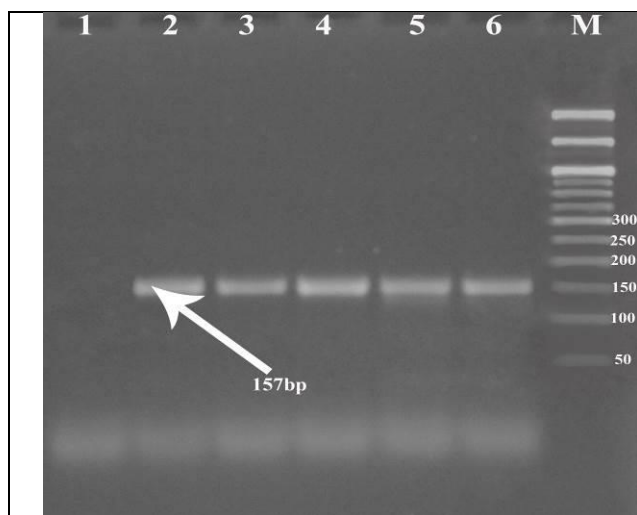
از میان ۳۰ سویه حساس به متی‌سیلین و فاقد ژن *mecA* که از نظر فنوتیپی هم منفی گزارش شده بود، ۹ ایزوله ژن *qacA/B* داشت و ۳ ایزوله هم حامل ژن *smr* بود (جدول ۳ و ۴). علاوه بر این، در ایزوله‌هایی دارای ژن *mecA* و مقاوم به متی‌سیلین، ۲۰ ایزوله ژن *qacA/B* و ۱۱ ایزوله ژن *smr* داشت (جدول ۳ و ۴). با استفاده از آنالیز آماری K2 مقادیر p value به‌دست‌آمده برای ژن‌های *mecA*، *qacA/B* و *smr* به ترتیب ۰/۰۰۳۳، ۰/۰۰۱۹ و ۰/۰۰۴۳ تعیین شد.



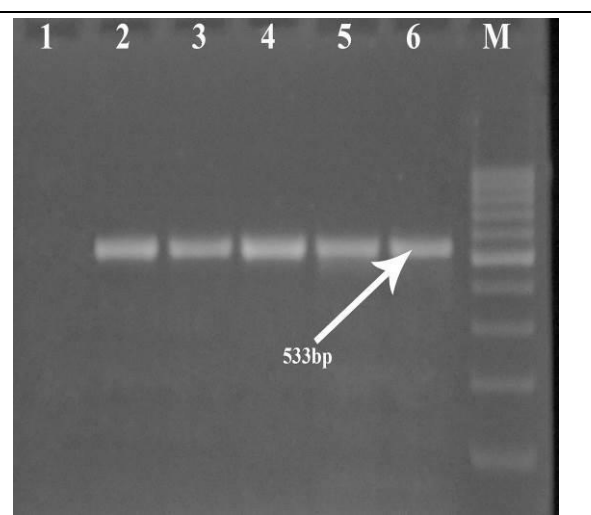
شکل ۱. فراوانی ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس بر اساس بخش‌های جدا شده از مراکز درمانی شهر زاهدان

جدول ۳. فراوانی ایزوله‌های استافیلوکوک حساس به متی‌سیلین حامل ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها و استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها بر اساس نوع نمونه بالینی

ژن مورد مطالعه	استافیلوکوک اورئوس (n=۸۹)	
	مقاوم به متی‌سیلین (n=۵۹)	حساس به متی‌سیلین (n=۳۰)
<i>mecA</i>	۵۰	۰
<i>qacA/B</i>	۲۰	۹
<i>smr</i>	۱۱	۳
p value		



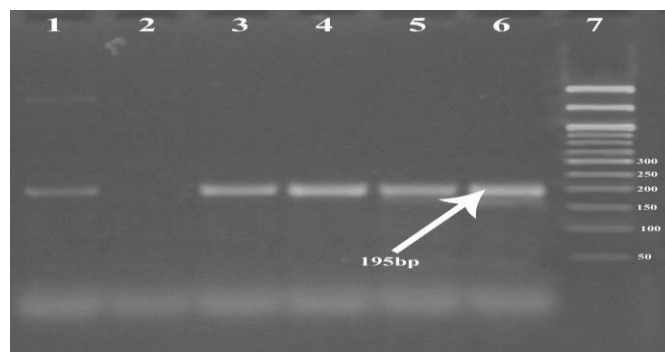
شکل ۳. نتیجه تکثیر ژن‌های *qacA/B* مربوط به عامل مقاومت به دترجنت‌ها. چاهک‌های ۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *qacA/B* و داری وزن مولکولی ۱۵۷ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۵۰ جفت بازی است.



شکل ۲. نتیجه تکثیر ژن‌های *mecA* مربوط به عامل مقاومت به متی‌سیلین. چاهک‌های ۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *mecA* و داری وزن مولکولی ۵۳۳ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت بازی است.

جدول ۴. فراوانی ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوک اورئوس*

استافیلوکوک اورئوس (n=۸۹)						نمونه‌های بالینی
استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (n=۵۹)			استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین (n=۳۰)			
<i>smr</i> (n=۱۱)	<i>qacA/B</i> (n=۲۰)	<i>mecA</i> (n=۵۰)	<i>smr</i> (n=۳)	<i>qacA/B</i> (n=۹)	<i>mecA</i> (n=۳۰)	
۲	۷	۱۹	۰	۴	۱۱	کشت ادرار
۰	۴	۶	۰	۰	۳	کشت خون
۶	۸	۱۱	۱	۲	۶	سوپاب بینی
۱	۰	۴	۰	۱	۳	زخم
۳	۱	۶	۲	۲	۱	کاتاتر
۰	۰	۴	۰	۰	۵	خلط
۰	۰	۰	۰	۰	۱	مایع مغزی- نخاعی



شکل ۴. نتیجه تکثیر ژن‌های *smr* مربوط به عامل مقاومت به دترجنت‌ها. چاهک‌های ۲ تا ۶ مربوط به نمونه‌های حاوی ژن‌های *smr* و داری وزن مولکولی ۱۹۵ جفت باز، چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک M مارکر ۵۰ جفت بازی است.

بحث

بیشترین میزان سویه‌های MRSA و دارای ژن‌های *smr* و *qacA/B* نمونه‌های ادراری و سوپاب بینی بود. این امر نشان‌دهنده توزیع سویه‌های مقیم در بینی در بین سویه‌های مقاوم است. این نتایج با گزارش‌های نوروزی و همکاران [۱۵] در تهران همخوانی داشت. در هر دو مطالعه، شیوع بالای ایزوله‌های حامل این ژن‌ها مشاهده شد. این در حالی است که ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* به‌طور طبیعی در قسمت بینی افراد مقیم است و حضور ژن‌های عامل مقاومت در بین این ایزوله‌ها را باید امری جدی در نظر گرفت [۲۲].

گزارش نوگاجی و همکاران [۳] از جداسازی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین و شوینده‌های آنتی‌موآن چهار ظرفیتی از نمونه‌های سوپاب بینی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. همچنین، نمونه‌های ادرار بیماران شامل بیشترین ایزوله‌های دارای ژن‌های *smr* و *qacA/B* *mecA* بود. این موضوع علاوه بر اینکه نشان‌دهنده حضور *استافیلوکوک اورئوس* در بین باکتری‌های عامل عفونت‌های ادراری است، گسترش قابل توجه ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در ایزوله‌های بالینی جداشده از عفونت‌های ادراری را نشان می‌دهد. این نتایج با مشاهدات آتر و

در این مطالعه، به بررسی ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها در سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در سال ۱۳۹۴ در شهر زاهدان پرداختیم. شیوع سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* از سوپی با فراوانی بالا مشاهده شد. حضور ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها و آنتی‌موآن‌های چهار ظرفیتی را نیز در طیف گسترده‌ایی از این سویه‌های مقاوم شاهد بودیم. با استفاده از آنالیزهای آماری مشخص شد که بین ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و ژن‌های *smr* و *qacA/B* ارتباط معناداری وجود دارد، به‌طوری که بیشترین میزان ایزوله‌های دارای ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌سپتیک‌ها، از ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداشده و تعداد زیادی از ایزوله‌های مورد آزمایش هر سه ژن مورد مطالعه را دارا بود. این در حالی بود که در بین ایزوله‌هایی که از نظر ژنوتیپی حساس به متی‌سیلین و فاقد ژن *mecA* بودند، تعداد بسیار کمی از ایزوله‌ها ژن‌های *qacA/B* و *smr* داشتند و هیچ یک از این ایزوله‌ها هر سه ژن را با هم نداشتند.

ژن های مقاومت به ضد عفونی کننده ها نیز است. گستردگی این ژن ها در دنیا و ایران با سرعت بالایی در حال افزایش است [۲۱]. با توجه به اینکه این ژن ها توانایی گردش بین سویه های را نیز دارد، باید با اتخاذ تدابیری نخست از گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک جلوگیری کرد، سپس سویه های مقاوم به آنتی سبتیک ها را با شناسایی ژنتیکی کنترل کرد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر حضور ژن های *qacA/B* و *smr* را در استافیلوکوکوس های اورئوس مقاوم به متی سیلین بررسی و ضرورت وجود توجه بیشتر و تحقیق گسترده تر در زمینه نوع، همچنین میزان ماده بیوسایدی مصرفی در محصولات بیوسایدی مورد م صرف گسترده را بیان می کند. همچنین، در بررسی حاضر ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به QACs و مقاومت به متی سیلین به دست آمد. در نتیجه، حضور هر کدام از این شاخص های مقاومت ممکن است به گزینش مشترک این دو به دزد جال در مان آنتی بیوتیکی یا به دزد جال مصرف مواد ضد عفونی کننده حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیم منجر شود. در نهایت، حضور ژن های *qac* در میان جمعیت استافیلوکوک اورئوس به خصوص سویه های مقاوم به بتالاکتام ها و توانایی آن ها در گسترش مقاومت تشنان و احتمال بروز مقاومت متقاطع با برخی آنتی بیوتیک ها، اهمیت سازوکارهای اتخاذ شده در کنترل عفونت مؤثر و استفاده از مواد بیوسایدی در غلظت توصیه شده را بیش از گذشته بیان می کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله لازم می دانند از کارشناسان آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی زاهدان و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی - گرمسیری تشکر کنند که ما را در انجام این طرح یاری کردند. این مقاله بخشی از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیته اخلاق به شماره ۷۱۵۲ است.

همکاران [۶] در انگلیس همخوانی دارد. همچنین، نتایج به دست آمده از میزان بالای آلودگی بیماران بخش مراقبت های ویژه در مطالعه حاضر با بررسی های آن ها کاملاً همخوانی داشت، به طوری که بیش از ۶۰ درصد از نمونه های این بخش حاوی ژن *qacA/B* و بیش از ۳۰ درصد هم دارای ژن *smr* بودند.

حضور هم زمان ژن های *qacA/B* بیان کننده ارتباط حضور این ژن ها با ژن عامل مقاومت به متی سیلین (*mecA*) بود. هورنر و همکاران [۲۳] در مطالعه ای مروری وجود ارتباط بین ژن های عامل مقاومت به برخی آنتی بیوتیک ها و ژن های عامل مقاومت به برخی بیوسیدها را گزارش کردند.

در مطالعات لانگتین و همکاران [۱۶] در کانادا، مگان و همکاران [۲۵] در آمریکا، و والی و همکاران [۱۸] و نوگچی و همکاران [۲۶] در ژاپن بین ژن های عامل مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین و ژن های عامل مقاومت به بیوساید ها ارتباطی گزارش نشد که با نتایج این مطالعه ناهمخوانی دارد. همچنین، در مطالعات ذکر شده فراوانی ژن *smr* بیش از *qacA/B* گزارش شده است که از این نظر هم با مطالعه حاضر هیچ گونه همخوانی ندارد. این ناهمخوانی در نتایج را می توان به اختلاف مناطق جداسازی شده نمونه ها، شرایط آب و هوایی و جغرافیایی متفاوت، تفاوت وجود جهش های باکتریایی در نواحی مختلف و انتقالات ژنتیکی متفاوت در بین باکتری ها نسبت داد [۲۴-۲۶].

زمانتار و همکاران [۲۸]، لی لاپورن و همکاران [۲۷]، و سیجو و همکاران [۲۹] در مطالعات جداگانه ای روی حضور ژن های عامل مقاومت به متی سیلین و بیوساید ها، فراوانی بالای ژن *qacA/B* را نسبت به ژن *smr* گزارش کردند. حضور بالای این ژن ها در نمونه های بالینی، به خصوص در نمونه های سوپ بینی و ادرار و کشت خون، بیان کننده ظهور عفونت هایی است که بر پایه استافیلوکوک های اورئوس استوار شده است که علاوه بر داشتن ژن های عامل مقاومت به آنتی بیوتیک ها، دارای

- [1] Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. Mikrobiyoloji Bulteni, 2007; 41(2): 309-27.
- [2] Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, et al. Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. J Antimicrob Chemother, 2013; 68(10): 2226-33.
- [3] Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. Journal of Medical Microbiology, 2005; 54(Pt 6):

557-65.

- [4] Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Molle G, Holzel C. First detection of the antiseptic resistance gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. Microbial Drug Resistance, 2012; 18(1): 7-12.
- [5] Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. European Journal of Microbiology & Immunology, 2015; 5(1): 44-61.
- [6] Otter JA, Patel A, Cliff PR, Halligan EP, Tosas O, Edgeworth JD. Selection for *qacA* carriage in CC22, but not CC30,

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection isolates during a successful institutional infection control programme. *J Antimicrob Chemother*, 2013; 68(5): 992-9.
- [7] Mc Gann P, Milillo M, Kwak YI, Quintero R, Waterman PE, Lesho E. Rapid and simultaneous detection of the chlorhexidine and mupirocin resistance genes *qacA/B* and *mupA* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013; 77(3): 270-2.
- [8] Aykan SB, Caglar K, Engin ED, Sipahi AB, Sultan N, Yalinay Cirak M. Investigation of the presence of disinfectant resistance genes *qacA/B* in nosocomial methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates and evaluation of their in vitro disinfectant susceptibilities. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2013; 47(1): 1-10.
- [9] Nakipoglu Y, Ignak S, Gurler N, Gurler B. The prevalence of antiseptic resistance genes (*qacA/B* and *smr*) and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 2012; 46(2): 180-9.
- [10] Wang B, Jessamine P, Desjardins M, Toye B, Ramotar K. Direct *mecA* polymerase chain reaction testing of blood culture bottles growing Gram-positive cocci and the clinical potential in optimizing antibiotic therapy for staphylococcal bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013; 75(1): 37-41.
- [11] Wan MT, Chou CC. Spreading of beta-lactam resistance gene (*mecA*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through municipal and swine slaughterhouse wastewaters. *Water Research*, 2014; 64: 288-95.
- [12] Huijbers PM, van Hoek AH, Graat EA, Haenen AP, Florijn A, Hengeveld PD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms. *Veterinary Microbiology*, 2015; 176(1-2): 120-5.
- [13] Uzunovic S, Bedenic B, Budimir A, Ibrahimagic A, Kamberovic F, Fiolic Z, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), extended-spectrum (ESBL)- and plasmid-mediated AmpC ss-lactamase -producing Gram-negative bacteria associated with skin and soft tissue infections in hospital and community settings. *Medicinski glasnik. official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 2015; 12(2): 157-68.
- [14] Chen FJ, Huang IW, Wang CH, Chen PC, Wang HY, Lai JF, et al. *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* with low-level oxacillin MIC in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 2012; 50(5): 1679-83.
- [15] Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. Detection of biocide resistance genes, *qacA/B* and *smr*, among isolated *Staphylococcus aureus* from clinical and non-clinical sources. *Pejouhandeh*, 2011; 16(2): 83-91.
- [16] Longtin J, Seah C, Siebert K, et al. Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55: 2999-3001.
- [17] Stickler DJ, Thomas B. Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. *J. Clin. Pathol*, 1980; 33: 288-296.
- [18] Vali L, Davies SE, Lai LL, Dave J, Amyes SG. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008; 61: 524-532.
- [19] Raggi C, Filippini P, Monaco M, Pantosti A, Creti R, et al. Methicillin resistance, biofilm formation and resistance to Benzalkonium chloride in staphylococcus aureus clinical isolates. *Clin Microbiol*, 2013; 2(10): 121.135.
- [20] Nahaei MR, Shahmohammadi MR, Ebrahimi S, Milani M. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and surveillance of antibacterial resistance in a multi-center study from Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015; 8(8): e19945.
- [21] 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.
- [22] Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. Detection of biocide resistance genes, *qacA/B* and *smr*, among isolated *Staphylococcus aureus* from clinical and non-clinical sources. *Pejouhandeh*, 2011; 16(2): 83-91.
- [23] Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012; 67(11): 2547-59.
- [24] Longtin J, Seah C, Siebert K, et al. Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55: 2999-3001.
- [25] McGann P, Kwak YI, Summers A, et al. Detection of *qacA/B* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a regional healthcare network in the eastern United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2011; 32: 1116-9.
- [26] Noguchi N, Hase M, Kitta M, et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999; 172: 247-53.
- [27] Leelaporn A, Paulsen IT, Tennent JM, et al. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol*, 1994; 40: 214-20.
- [28] Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, 2011; 4(1): 1-9. doi: 10.1186/1756-0500-4-453.
- [29] Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with *b*-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002; 46: 2797-803.