مقاله اصیل

بررسی شیوع ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia در میان ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیمارستان های منتخب مشهد

آزاده حداد سبزوار*[1]، حسن عبداله زاده [2]

[1] کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران

[2] MD و MPH بهداشت باروری، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

***نشانی نویسنده مسئول:** مشهد، **دانشگاه آزاد** اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، آزاده حداد سبزوار
E-mail: hadad.azadeh@yahoo.com

وصول:۹۴/۵/۴، اصلاح:۹۴/۸/۱۴، پذیرش:۹۴/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) یکی ازعوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی ازجامعه است. هدف ازانجام این پژوهش، بررسی شیوع ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia در میان ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیمارستان های منتخب مشهد می باشد.

مواد و روش‌ها: روش انجام مطالعه از نوع مقطعی (از مهرماه ۱۳۹۲ تا تیرماه ۱۳۹۳ از نمونه های بالینی مختلف بیمارستان های قائم، پاستور، امام هادی (ع)، امام رضا (ع) مشهد) و به صورت توصیفی – تحلیلی می باشد. پس از جمع آوری ٤٥ ایزوله بالینی MRSA الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌ها به روش انتشار از دیسک توسط دیسک‌های آنتی بیوتیکی اگزاسیلین، جنتامیسین، توبرامایسین، آمیکاسین و کانامایسین با رعایت اصول CLSI تعیین شد. برای تشخیص و تعیین فراوانی ژن مقاومت mecA (جهت تشخیص قطعی MRSA) و ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Iah از روش PCR استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده پس از ورود به نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ با استفاده از آزمون کای دو در سطح معناداری P<۰/۰۰۰۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: در این پژوهش، جمعاً ٤٥ نمونه MRSA مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۱٪ از نمونه ها از زخم و به ترتیب ۳۷ ٪ ، ۷٪ و ۵٪ نمونه‌ها از خون، ادرار و خلط ایزوله شده بودند. بر اساس نتایج حاصل از آنتی بیوگرام، نمونه‌های MRSA بیشترین مقاومت را به ترتیب نسبت به کانامایسین (۸۰٪)، توبرامایسین (۷۱٪)، آمیکاسین (۵۳٪) و جنتامایسین (۳۱٪) نشان دادند. ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia در ٢٤/٤٤ درصد از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین شناسایی شد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر نسبت به سایر تحقیقات شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی کمتر می باشد که می تواند به علت شیوع کمتر مکانیسم های مقاومتی در این ایزوله ها باشد. تفاوت مشاهده شده در نتایج مطرح کننده تنوع الگوی مقاومت به آمینوگلیکوزید ها در نواحی جغرافیایی مختلف است.

واژه‌های کلیدی: *ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia، استاف اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیمارستان مشهد.*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus) به عنوان یک عامل بیماری زای قدرتمند که عفونت های متعددی را ایجاد می کند، شناخته شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین همچنین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام‌ها (Beta Lactam)، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها (Tetracycline)، فلوروکوئینولون‌ها (Fluoroquinolones) و ماکرولیدها (Macrolides) کسب کرده است. بنابراین امروزه تعداد محدودی از آنتی بیوتیک ها به عنوان داروهای ضد استافیلوکوکی همچون ونکومایسین (Vancomycin) و تیکوپلانین (Teicoplanine) در دسترس هستند (۱,۲).

تولید Penicillin G در اواسط سال های ۱۹٤۰ بهبودی قابل توجهی در پیش آگهی عفونت های استافیلوکوکی به وجود آمد اما با ادامه مصرف آنتی بیوتیک ها سوش های مقاوم به ترکیبات پنی‌سیلین به علت توانایی استافیلوکوک ها در تولید بتالاکتامازها در سال ۱۹٤۲ گزارش گردید (۳). متی‌سیلین اولین پنی سیلین نیمه صنعتی مقاوم در برابر بتالاکتامازها است که در سال ۱۹۵۹ به بازار عرضه گردید. مدت کوتاهی بعد از تولید متی سیلین سوش های استافیلوکوک مقاوم به آن در سال ۱۹٦۱ گزارش گردید که این سوش ها را MRSA (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus) نامیدند (٤,۵).

مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک‌ها ناشی از تولید بیش از حد PBP2a است که پروتئین متصل شونده به پنی سیلین(PBP: Penicillin-Binding Protein)، تغییر یافته و تمایل کمی برای اتصال به آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام نشان می دهد (٦-۵). اهمیت بالینی آمینوگلیکوزیدها از آن جهت است که برعلیه طیف وسیعی از باکتری های هوازی به خصوص باکتری های گرم منفی، بسیاری از استافیلوکوک ها و برخی استرپتوکوک ها مؤثر می باشند و بیشترین کاربرد را در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها نشان می دهند (۷).

ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام و یا گلیکوپپتیدها ایجاد اثر سینرژیستی روی جدایه های حساس نموده و می تواند در درمان عفونت ها مؤثر باشد. مقاومت اکتسابی به آمینوگلیکوزیدها هم در باکتری های گرم منفی و هم در باکتری های گرم مثبت گزارش شده است (۸). سه مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه ریزوبیومی اتصال دارو، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیرفعال سازی آنزیماتیک دارو، مسئول مقاومت به آمینوگلیکوزیدها می باشند. از این بین غیرفعال سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم های تغییر دهنده‌ی آن ها، اصلی ترین مکانیسم مقاومت به این داروها در باکتری ها می باشد. سویه های مقاوم توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها-Aminoglycoside) (AMEs: modifying enzymes) دارا هستند. سویه های تولید کننده AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره ای گوناگون را از بین می برند (۹).

در واقع مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها در بین استافیلوکوک‌ها به طور معمول، به دلیل تغییرات آنزیمی ایجاد می شود. Aminoglycoside-modifying Enzymes (AME) در چهار کلاس طبقه بندی می شوند که مربوط به تغییرات آنزیمی آن ها است. شامل استیل ترانسفرازها (AACs)، فسفوترانسفرازها (APHs)، نوکلئوترانسفرازها (ANTs) و آدنیل ترانسفرازها (AADs) هستند. AMEs می تواند با پلاسمیدها یا با کروموزوم ها و حتی اغلب توسط عناصر متحرک ژنتیکی ایجاد شوند (۱۰,۱۱).

شایع ترین AMEs در بین استافیلوکوک‌ها-N-6´ acetyltransferase-2´´-O-phosphotransferase

[AAC(6´)-APH(2´´)] است که توسط ژن aac(6´)-Ie-aph(2´´) کد می شود و می تواند آنتی بیوتیک های جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، نئومایسین و آمیکاسین را غیرفعال می کند. 3´-O-Phosphotransferase III [APH(3´)-III] توسط ژن aph(3´)-IIIa کد می شوند و می تواند آنتی بیوتیک های کانامایسین و نئومایسین و توبرامایسین را غیر فعال می کند. 4´-O-Adenyltransferase I [ANT(4´)-I] توسط ژن ant(4´)-Ia کد می شوند و کانامایسین و نئومایسین و توبرامایسین را غیرفعال می کند (۱۲).

با وجود شیوع بالای مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوک ها خصوصاً بین MRSA در حال حاضر اطلاعات کمی در مورد بروز نوع AMEs در بیشتر کشور های جهان وجود دارد (۱۱). این کمبود اطلاعات و عدم آگاهی در نواحی شرق میانه و مناطق خلیج فارس که شیوع آن بالاست، بیشتر مشاهده می‌شود. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین فراوانی ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia کدکننده یک از مهم ترین آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزید ها با روش PCR در سویه‌های استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به متی سیلین جمع آوری شده از نمونه های بالینی بیمارستان های منتخب مشهد در مقطع زمانی مهر ۱۳۹۲ تا تیرماه ۱۳۹۳ است.

مواد و روش ها

روش انجام مطالعه از نوع مقطعی و به صورت توصیفی – تحلیلی می باشد. در این پژوهش، باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس از تاریخ مهر ۱۳۹۲ تا تیر ۱۳۹۳ از نمونه های بالینی مختلف نظیر زخم، آبسه، خلط، خون، ادرار از بیمارستان های قائم، پاستور، امام هادی (ع)، امام رضا (ع) مشهد به روش نمونه گیری در دسترس و به تعداد ۱۰۰ نمونه جمع آوری شدند.

نمونه ها مربوط به بیماران سرپایی و بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان در مدت زمان انجام پژوهش بودند. پس از تأیید هویت جدایه ها با استفاده از روش های آزمایشگاهی (از جمله رنگ آمیزی گرم، کشت در محیط کشت مانیتول سالت آگار، تست کاتالاز، کشت در محیط بلادآگار در حضور دیسک نئوبیوسین و عدم رشد در این محیط و تست Dnase) سویه های استافیلوکوکوس اورئوس را جدا کرده و سپس نمونه ها جهت نگهداری برای انجام آزمایشات بعدی ذخیره می شوند.

شناسایی فنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی: جهت شناسایی فنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از آنتی بیوتیک اگزاسیلین (30 µg) بر روی محیط مولر هینتون آگار مطابق استاندارد های CLSI انجام شد. در این آزمایش از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ATCC 20213 از انستیتوپاستور تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با روش دیسک آگار دیفیوژن (Disk agar diffusion) و براساس روش Kirby-bauer و مطابق با استاندارد های CLSI بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گرفت (۱۳).

دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده از شرکت Mast Diagnostics (ساخت انگلستان) تهیه شدند و عبارت اند از: جنتامایسین (10 µg)، آمیکاسین (30 µg)، کانامایسین (30 µg) و توبرامایسین (10 µg) بودند. قطر هاله‌های رشد با خط کش اندازه گیری و تفسیر آن با توجه به جدول NCCLS انجام گرفت. برای این کار محیط مولر هینتون آگار و سوسپانسیون میکروبی (کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند) تهیه و توسط سواپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار در سه جهت مختلف کشت داده شد و بعد از ۱۵ دقیقه دیسک‌ها با فاصله لازم در کنار هم قرار گرفتند و پس از ۲٤ ساعت انکوبه، قطر هاله های رشد یافته اندازه‌گیری شد. با کمک جدول استاندارد موجود نتایج بر اساس حساسیت (S)،

مقاوم (R) و هاله های نیمه حساس نیز به صورت (I) گزارش شدند.

برای شناسایی مولکولی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین استخراج DNA به روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل (PCI) انجام شد(١٤). جهت استخراج DNA باکتری ها در محیط لوریابرتانی کشت داده شدند. برای ردیابی ژن های مقاومت به متی سیلین mec A با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (F-5´-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C) و (R-5´-AGT TCT GGA GTA CCG GAT TTG) انجام گرفت.

واکنش PCR برای ردیابی ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia : برای ردیابی ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia از تکنیک PCR استفاده شد. برای تکثیر ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia از دو جفت آغازگر (Primer) اختصاصی استفاده شد (جدول ١). مخلوط واکنش در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل ٠/١ میکرومول از هر آغازگر، ٢/٥ میکرولیتر بافر ١٠X، ٢/٥ میلی مول $MgCl_2$، ٠/٢ میلی مول dNTPs، ٢/٥میکرولیتر DNA الگو، ١/٥ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (از شرکت CinnaGen) بود. حجم نهایی با آب دیونیزه استریل به ٢٥ میکرولیتر رسانده شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Kyratec (ساخت کشور کره) به این صورت تنظیم شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در ٩٤ درجه سانتی گراد برای ٥ دقیقه و بعد از آن ٣٠ چرخه شامل واسرشتگی در ٩٤ درجه سانتی گراد برای ٤٥ ثانیه، اتصال در ٥٦ درجه سانتی گراد برای ٤٥ ثانیه، تکثیر در ٧٢ درجه سانتی گراد برای ٤٥ ثانیه و تکثیر نهایی در ٧٢ درجه سانتی گراد برای ١٠دقیقه انجام گرفت.

در واکنش PCR از DNA الگو سویه استاندارد استافیلکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ATCC 20213 از انستیتوپاستور تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ١درصد در کنار مارکر استاندارد با باندهای ١٠٠ جفت بازی الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. باندهای DNA با استفاده از اشعه ماروای بنفش دستگاه ژل داک مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS18 و آزمون کای دو با سطح معناداری P<٠/٠٠٠١ انجام شد. همچنین ملاحظات اخلاقی (رضایت آگاهانه، رازداری و غیره) مربوط به تحقیقات بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مدنظر قرار گرفت.

یافته ها

از تعداد کل نمونه های جمع آوری شده، ١٠٠ نمونه از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفتند. نتایج تست آنتی‌بیوگرام برای دیسک اگزاسیلین نشان داد که تعداد ٤٥ سویه (٤٥٪) از سویه های جمع آوری شده MRSA یا مقاوم به متی سیلین هستند، که از این تعداد ٤٩ درصد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از زنان و ٥١ درصد از مردان جمع آوری شد. فراوانی نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب محل جمع آوری و نوع نمونه در جدول ٢ نشان داده شد. در میان نمونه های جمع آوری شده بیشترین میزان مقاومت به متی سیلین را در نمونه زخم می توان بررسی کرد. همچنین از نمونه های جمع آوری شده، ٦٦٪ (٣٠ سویه) مربوط به عفونت بیمارستانی و ٣٤٪ (١٥ سویه) مربوط به عفونت کسب شده از جامعه بود. نتایج مقاومت سویه های مورد مطالعه در برابر آنتی بیوتیک های خانواده آمینوگلیکوزید نشان داد که ٨٠ درصد سویه ها به کانامایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر توبرامایسین (٧١٪)، آمیکاسین (٥٣٪) و جنتامایسین (٣١٪) مشاهده شد. بر اساس نتایج فنوتیپی، بیشترین درصد مقاومت همزمان در ٨٤ درصد سویه ها نسبت به کانامایسین و توبرامایسین دیده شد و پس از آن ٤١ درصد از سویه ها مقاومت همزمان به توبرامایسین،

جدول ۱: توالی آغازگر مورد استفاده به همراه اندازه قطعات محصول PCR

ژن	پرایمر	توالی ´۳-´۵	اندازه قطعه (bp)
mecA	mecA-F	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	۵۳۳
	mecA-R	AGT TCT GGA GTA CCG GAT	
aac(6_)-Ie-aph(2_)-Ia	AE2-F	CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG	۳٤۸
	AE2-R	CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه های مختلف مورد آزمایش جدا شده از بیماران بیمارستان منتخب مشهد

نوع نمونه	بیمارستان قائم		بیمارستان پاستور		بیمارستان امام هادی(ع)		بیمارستان امام رضا (ع)		جمع کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
زخم	۸	۳٤,۷۸	۳	۱۳,۰٤	۵	۲۱,۷۳	۷	۳۰,٤۳	۲۳	۱۰۰
خون	۵	۳۱,۲۵	۱	۶,۲۵	۳	۱۸,۷۵	۷	٤۳,۷۵	۱۶	۱۰۰
خلط	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۱۰۰	۲	۱۰۰
ادرار	۳	۷۵	۰	۰	۰	۰	۱	۲۵	٤	۱۰۰
حجم نمونه	۱۶		٤		۸		۱۷		٤۵	۱۰۰

جدول ۳: نتایج فنوتیپ مقاومت و درصد جدایه های مقاوم به آنتی بیوتیک های خانواده آمینوگلیکوزید

درصد جدایه های مقاوم	فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی
۳۱	GM
۷۱	TN
۸۰	K
۵۳	AK
۸٤	TN,K
٤۱	AK,TN,K
۱۹	GM,TN,K
۱۶	GM,TN,K,AK

GM: جنتامایسین، K: کانامایسین، TN: توبرامایسین، AK: آمیکاسین

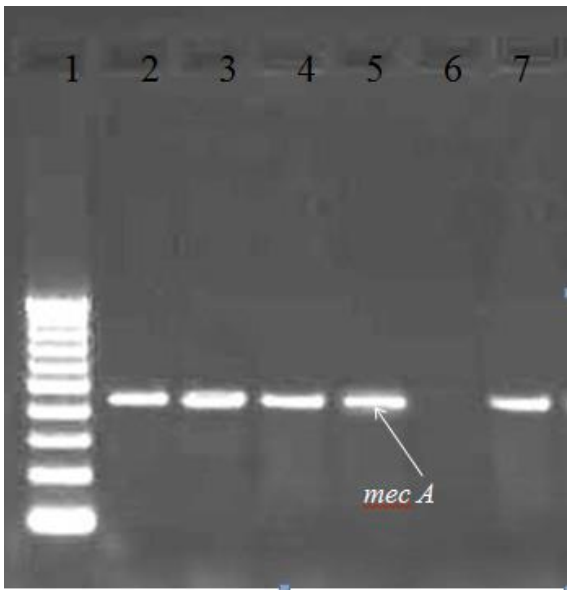
جدول ٤: نتایج فنوتیپی مقاومت و حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia در میان جدایه های دارای ژن مقاومت

درصد ژن	فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی
٤	GM-AK-TN-K
۲	GM-TN
۲۲	AK-TN-K
٤	AK
۱۱	K
۲	GM
۱۵	TN

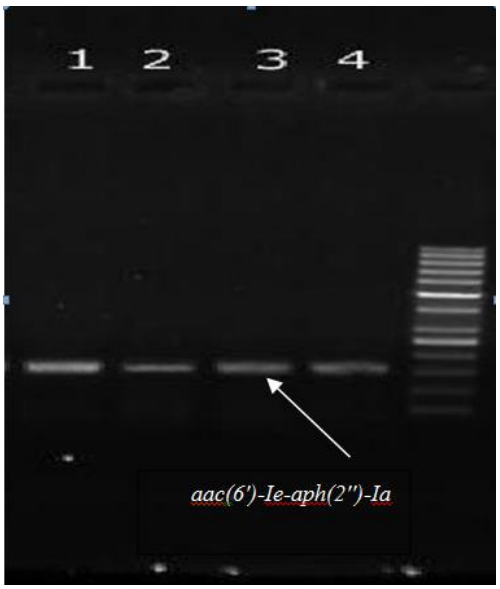
GM: جنتامایسین، K: کانامایسین، TN: توبرامایسین، AK: آمیکاسین

کانامایسین و آمیکاسین و ۱۹ درصد از سویه ها به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، توبرامایسین و کانامایسین مقاوم بودند. مقاومت همزمان نسبت به همه آنتی بیوتیک های به کار برده شده تنها ۱۶درصد بود (جدول۳).

نتایج PCR سویه های مورد مطالعه نشان داد که ٤۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین تایید شده با دیسک اگزاسیلین حاوی ژن mec A بودند (شکل ۱). همچنین نتایج نشان داد که ۱۱ سویه (۲٤/٤٤ درصد) حاوی ژن مقاومت ژن aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia را دارند (شکل ۲). نتایج فنوتیپ مقاومت آنتی بیوتیکی و



شکل ۱- نمونه های بالینی استافیلوکوک اورئوس حامل ژن‌های mec A
ردیف ۱ و ۸: DNA Size Marker 100bp
ردیف ۲ : کنترل مثبت برای ژن‌های ذکر شده در بالای باند
ردیف های ۳، ٤ و ٥ و٧ : سویه‌های حامل ژن ذکر شده در بالای باند



شکل ۲- نمونه های بالینی استافیلوکوک اورئوس حامل ژن‌های aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia
ردیف ٥: DNA Size Marker 100bp
ردیف ۱ : کنترل مثبت برای ژن‌های ذکر شده در بالای باند
ردیف های ۲ و ۳ و ٤: سویه‌های حامل ژن ذکر شده در بالای باند

درصد حضور ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia نشان داد که ۲۲ درصد باکتری های دارای مقاومت همزمان نسبت به آمیکاسین، توبرامایسین و کانامایسین، ژن aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia را نیز دارند (جدول ٤).

بحث

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن عوارض جانبی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها نسبت به این دارو ها دارد، همچنان در درمان عفونت های باکتریایی با ارزش است. معمول ترین مکانیسم مقاومت به آمینوگلیکوزید ها، تغییر آن ها توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها است، به صورتی که این آنتی بیوتیک ها دیگر قادر به اتصال به ریبوزوم سلول نیستند (۱۵). ژن های کد کننده این آنزیم ها یا روی پلاسمید و یا روی کروموزوم قرار دارند (١٦).

در این تحقیق شیوع ژن مقاومت aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia در میان ٤٥ سویه مقاوم به متی سیلین از ۱۰۰ سویه جداشده از بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان های منتخب مشهد با استفاده از روش PCR بررسی شد.

در این مطالعه مشخص شد که ۸۰ درصد سویه ها (از ٤٥ سویه مقاوم به متی سیلین) به کانامایسین مقاوم بودند و پس از آن بیشترین مقاومت به ترتیب در برابر توبرامایسین (۷۱٪)، آمیکاسین (۵۳٪) و جنتامایسین (۳۱٪) مشاهده شد.

یادگار و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقاومت به کانامایسین، توبرامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ٦٨٪، ۵۳٪، ۵۲٪ و ٤٨٪ گزارش کردند (۱۷). فتح اله زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ مقاومت به کانامایسین، توبرامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۹۷٪، ۹٦٪، ۸۷٪ و ۹۳٪ گزارش شد (۱۸) و براساس تحقیق صورت گرفته توسط طاهری کلانی و امانئینی در سال ۲۰۰۹ مقاومت به جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین به ترتیب ۷۲/۵٪، ۷۲/۵٪، ۷۲/۹٪ و ۷۲/۹٪ بود (۱۹)، البته در مطالعات دیگر نتایج متفاوت بوده از جمله در مطالعه Su Mi Choi و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت مقاومت به جنتامایسین ۱۰۰٪ (۲۰) و در مطالعه Schmitza و همکارانش در سال ۱۹۹۹ که شیوع مقاومت آمینوگلیکوزیدی در گونه های استافیلوکوکوس اورئوس

جدا شده از ۱۹ بیمارستان در اروپا بررسی شد حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به جنتامایسین ۹ درصد نسبت به مطالعات گذشته کاهش یافته (۲۱) و بر اساس مطالعات انجام شده توسط مصطفوی زاده و همکاران در سال ۱۳۸۷ مقاومت به آمیکاسین ۷۱/٤٪ بود.

مقایسه بین نتایج مطالعات مختلف مشاهده می شود که با گذشت زمان میزان مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزید رو به افزایش است، اما تفاوتی که در نتایج به دست آمده از سایر مطالعات و مطالعه حاضر مشاهده می شود، می تواند به دلیل تفاوت در منطقه جغرافیایی یا تفاوت در تعداد جدایه های مورد آزمایش باشد که نیاز به بررسی های بیشتر دارد. همچنین برای اثبات افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، لازم است مطالعه حاضر به صورت سالانه در همین مراکز درمانی به صورت مجدد تکرار گردد.

در تحقیق حاضر ۲٤/٤٤٪ نمونه ها حامل ژن aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia بودند، این ژن کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، نئومایسین و آمیکاسین می باشد. طاهری کلانی و امانئینی شیوع ژن های aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia را ۹۳/۷٪ اعلام نمود (۱۹). بر اساس تحقیق فتح اله زاده و همکاران شیوع ژن های aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia ۸۳٪ گزارش شد (۱۸) که نسبت به تحقیق حاضر شیوع بالاتری را نشان می دهد.

مطالعات صورت گرفته توسط فتح اله زاده و همکاران در داخل کشور شایع ترین ژن aac(6′)-Ie-aph(2″)-Ia بود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. همانطوری که مشاهده می‌شود مقاومت در بین سویه‌های استافیلوکوک ارئوس در تحقیق حاضر نسبت به مطالعات ذکر شده در بالا شیوع کمتری دارد که می تواند مربوط به شیوع کمتر مکانیسم های مقاومتی (ژن‌های دخیل در مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، افلاکس پمپ ها و ...) در این ایزوله ها باشد. در ضمن عدم همخوانی نتایج می تواند به علت تفاوت در اپیدمیولوژی مولکولی باشد. همچنین تفسیر نتایج با نرم افزار SPSS نشان داد که بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و حضور ژن های مقاومتی رابطه معنی داری وجود دارد (p.value کوچکتر از ۰/۰۵). با توجه به مقاومت بالای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در پژوهش حاضر و پژوهش های مشابه و فراگیر بودن آن در محیط های بیمارستانی، برای پیشگیری از انتشار سویه های مقاوم، روش های کنترل موثرتر در ضد عفونی محیط بیمارستان از یک طرف و کاهش مصرف بی رویه آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از طرف دیگر باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین به علت افزایش شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تشخیص سریع و به موقع سویه های مقاوم به منظور انتخاب گزینه های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می رسد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد جهت انجام تحقیق حاضر کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1. Novick PR, Schelievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect. 2001; 3(7): 585-94.
2. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 2003; 111(9): 1265-73.
3. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell Mol Life Sci. 2010;67(18):3057-71.
4. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology. 2009;7(9):629-41.
5. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular

evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 2007;13(3):222-35.
6. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, et al. Detection and expression of Methicillin/oxacillin resistance in Multidrug-resistant and non-Multidrug- resistant Staphylococcus aureus in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother. 2002;49(5):793-801.
7. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(3): 430-50.
8. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(4): 727–37.
9. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga, A, Inoue M. Identification of aminoglycosidemodifying enzymes by susceptibility testing: epidemiologyof methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. J Clin Microbiol. 2001; 39(9):3115–21.
10. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides andmacrolide resistance among Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates from hospitals in Tehran. Pol J Microbiol. 2008; 57:173–8.
11. Emaneini M, Taherikalani M, Eslampour MA, Sedaghat H, Aligholi M, Jabalameli F, et al. Phenotypic and Genotypic Evaluation of Aminoglycoside Resistance in Clinical Isolates of Staphylococci in Tehran, Iran. Microb Drug Resist. 2009; 15(2):129-32.
12. Ounissi H, Derlot, E Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymesin gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother.1990;134(11):2164–8.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document. 2010.M100-S20.
14. Karimnasab N, Tadayon K, Khaki P, Moradi Bidhendi S, Ghaderi R, Sekhavati M, Asadi F. An optimized affordable DNA-extraction method from Salmonella enterica Enteritidis for PCR experiments. Archives of Razi Institute. 2013; 68(2): 105-9.
15. Bellaaj Zouari A, Bollet C, Ben-Mahrez K. Characterization of the 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene aac(3)-IIa of a clinical isolate of Escherichia coli. Ann Microbiol. 2003; 53: 211-7.
16. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycosidemodifying enzymes in grampositive cocci. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34(11): 2164-8.
17. Yadegar A, Satary M, Mozafari N, Godarzi Gh. Prevalence of genes ant(4´)-Ia among clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by Multiplex-PCR. Journal of Medical Science Teacher. 2010. (12) 59-68.
18. Fathollahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi M, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, et al. Characterization of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(3): 264–265.
19. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Aligholi M, Gilbert G, Taherikalani M, Jonaidi N, et al. Molecular characterization of methicillin resistant Staphylococcus aureus clones from teaching hospital in Tehran. Jpn J Infect Dis. 2009; 62(4):309-11.
20. Choi SM, Kim S, Kim C, Lee D, Choi J, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci. 2003; 18(5): 631-6.
21. Schmitz 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. Journal Antimicrob Chemother. 1999. 43(2): 253-9.

Original Article

Evaluate the Prevalence of aac(6')-Ie-aph (2″)-Ia Gene among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates from the Hospital Mashhad

Azadeh Hadad Sabzevar
MS, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Hasan Abdolahzade
MD, MPH, Reproductive Health, Department of Social Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Received:26/07/2015**, Revised:**05/11/2015**, Accepted:**20/01/2016

Corresponding author:
Azadeh Hadad Sabzevar,
Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
E-mail: hadad.azadeh@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus is a major cause of nosocomial and community-acquired infections. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia gene among clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Mashhad hospitals.

Materials & Methods: This study was cross-sectional and descriptive-analytic (from September 2013 to July 2014 performed on clinical samples of Ghaem, Pasteur, Imam Hadi, Imam Reza hospitals in Mashhad). After collecting 45 clinical isolates of MRSA antimicrobial, sensitivity pattern of isolates was determined by disk diffusion method using disks of oxacillin, gentamicin, tubramycin, amikacin, and kanamycin according to the CLSI guidelines. PCR method was used for detection and determination of prevalence of mecA antimicrobial-resistance gene (used to confirm the diagnosis of MRSA) and aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia genes. Data collected after the entry into SPSS version 18 using chi-square test.

Results: In this study, 45 cases of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus were evaluated. %51 of cases was isolated from ulcers; while %37, %7 and %5 were respectively isolated from blood, urine and sputum. According to the antibiotic sensitivity test results, Staphylococcus aureus isolates were resistant against kanamycin (%80), tobramycin (%71), amikacin (%53) and gentamicin (%31). The aac(6')-Ie-aph(2″)-Ia gene at %44/24 of isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus was detected.

Discussion: Compared to others, this study shows lower rate of antimicrobial resistance which could be due to lower frequency of resistance mechanisms (Aminoglycoside-resistance genes, efflux pomps, …) in these isolates. The discrepancy between results could also point to diversity in aminoglycoside-resistance in different geographical regions.

Keywords: *Gene aac(6')-Ie-aph(2")-Ia, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Hospital Mashhad*