

Investigation and Identification of the *nuc*, *fem B* *mecA* and *aac(6')/aph(2'')-Ia* Genes in the *Staphylococcus Aureus* Isolated from Northwest Iran by Multiplex PCR Method

Mahdad Kiani Nia¹, Alka Hasani^{2*}, Akbar Hasani³, Yaeghob Sharifi⁴, Sina Mirza Ahmadi⁵, Leila Deghani⁶

¹Department of Microbiology, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Iran

²Research Center of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Microbiology, School of Medicine and Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Medical Biochemistry and Laboratory Sciences, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Department of Microbiology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁵Department of Genetics, Islamic Azad University of Zanjan, Iran

⁶Laboratory Technician, Microbiology Laboratory, Sina Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 18 Jul, 2012 Accepted: 24 Sep, 2012

Abstract

Backgrounds and Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the most common pyogenic bacteria possessing highest potentiality to develop resistance to antibiotics. Emergence of resistance towards the most common antibiotics such as aminoglycoside and vancomycin has added burden to the existing MRSA situation. Aminoglycosides are important bactericidal agents. The aminoglycoside resistance is due to drug inactivation by plasmid- or transposon-mediated aminoglycoside modifying enzymes. The aim of this study was to develop a Multiplex-PCR assay for rapid and accurate detection of *S. aureus* and its resistance genes to aminoglycoside and methicillin.

Materials and Methods: Isolates of *S. aureus* were obtained from various clinical specimens based on standard bacteriological procedures. The antimicrobial susceptibility of the strains was determined using the disk diffusion method. Extraction of genomic DNA was carried out by SDS-Proteinase K method modified with CTAB. The Multiplex-PCR assay was carried out for detection of *mecA*, *nuc*, *femB* and *aac(6')/aph(2'')-Ia* genes.

Results: Totally 1,389 specimens examined 90 strains of *S. aureus* were isolated. Antibiotic susceptibility testing using disc diffusion revealed high resistance to penicillin (97.8%). Among the isolates *nuc*, *femB* and *mecA* genes were detected in 90(100%), 86 (95/6%) and 58 (64/4%) strains, respectively. Additionally, 44 (48/9%) strains were found to harbor *aac(6')/aph(2'')-Ia* gene.

Conclusion: This study highlights that the multiplex PCR method described herein is not only a convenient method for rapid and accurate detection of *S. aureus* species but also it detects the presence of common antibiotic - resistant genes.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Aminoglycosides, Multiplex PCR

* Corresponding author:

E-mail: dr.alkahasani@gmail.com

مقاله پژوهشی

بررسی و شناسایی ژن های *mecA* *fen B* *nuc* و *aac(6')/aph(2'')-Ia* در استافیلوکوکوس اورئوس های ایزوله شده از منطقه شمالغرب ایران با روش Multiplex PCR

مهرداد کیانی نیا: گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
آلکا حسینی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:
Email: dr.alkahasani@gmail.com

اکبر حسینی: گروه بیوشیمی و آزمایشگاه های بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
یعقوب شریفی: گروه میکروب شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
سینا میرزا احمدی: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
لیلا دهقانی: آزمایشگاه میکروب شناسی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۴/۲۸ پذیرش: ۹۱/۷/۳

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری شایع پیوژنیک است که دارای قابلیت بالقوه برای کسب مقاومت به آنتی بیوتیکهای جدید می باشد. ظهور مقاومت به آنتی بیوتیکهای رایج مانند آمینوگلیکوزیدها و ونکومايسین به وضعیت موجود یعنی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) افزوده شده است. آمینوگلیکوزیدها از مهمترین عوامل ضد باکتریایی مورد استفاده برای درمان عفونتهای باکتریایی می باشند. هدف مطالعه، توسعه Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و دقیق همزمان سویه های استافیلوکوک اورئوس و ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید و متی سیلین می باشد. **مواد و روش ها:** ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های مختلف بالینی با استفاده از روشهای استاندارد باکتری شناسی بدست آمد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، با روش دیسک دیفیوژن تست تعیین گردید. استخراج ژنوم DNA با روش SDS-Proteinase K همراه با CTAB صورت گرفت. شناسایی ژنهای *mecA* *fenB* *nuc* و *aac(6')/aph(2'')-Ia* با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام شد. **یافته ها:** از کل ۱۳۸۹ نمونه بالینی ارسالی به آزمایشگاه، تعداد ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا و تعیین هویت شد. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها، بیانگر بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۹۷/۸٪) بود. ژنهای *mecA* *fenB* *nuc* بترتیب در ۱۰۰٪، ۹۵/۶٪ و ۶۴/۴٪ سویه ها شناسایی گردید. همچنین ۴۸/۹٪ سویه ها حامل ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* بودند. **نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که Multiplex PCR نه فقط یک روش مناسب برای تشخیص سریع استافیلوکوک اورئوس می باشد بلکه حضور ژنهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای رایج را هم شناسایی می کند.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، آمینوگلیکوزایدها، Multiplex PCR

مقدمه

عمومی و کنترل عفونت های بیمارستانی، هنوز هم استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم در انسان محسوب می شود (۴). معرفی آنتی بیوتیک های جدید علیه عفونت های استافیلوکوکی باعث تغییرات قابل توجهی در روند تکامل باکتریایی شده است، بطوریکه استفاده از داروهای جدید در بیشتر موارد با پیدایش سریع مقاومت استافیلوکوک ها همراه بوده است (۵). در سال ۱۹۵۹ اولین پنی سیلین نیمه صناعی به نام متی سیلین، برای غلبه بر مشکلات ایجاد شده از افزایش تولیدات پنی سیلینازی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به پنی سیلین معرفی شد

انتشار سریع و تصاعدی استافیلوکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف که در ارتباط با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک می باشد، یک مشکل عمده جهانی را به وجود آورده است (۳-۱). استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت است که عامل عفونت های متعددی از جمله اندوکاردیت، عفونت های زخم، سپتی سمی و باکتری می باشد و افراد ناقل این باکتری به عنوان منبع مهمی برای ایجاد بیماری در افراد سالم محسوب می شوند (۴). با افزایش روز افزون مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها، علی رغم بکارگیری آنتی بیوتیک های قوی و بهبود شرایط بهداشت

اولیه ایزوله ها با تست هایی فنوتیپی معمول نظیر کشت روی بلاد آگار و مانتیول سالت آگار برای نمونه از بینی (Hi-Media, India)، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کوآگولاز و DNase انجام شد (۱۲). تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها، با روش انتشار از دیسک بر روی آگار (Kirby-Bauer) با دیسک های آنتی بیوتیکی (MAST Diagnostics, UK) شامل: پنی سیلین (G 10U)، جنتامایسین (10µg)، اریترومایسین (15µg)، ونکومایسین (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، کلیندامایسین (2µg)، ریفامپین سین (5µg)، لینوزولید (30µg)، آگراسیلین (5µg)، سفوکسی تین (30µg) و سفازولین (30µg) بر روی محیط مولر هیتون آگار (Hi-Media, India) با رعایت استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007) تعیین گردید (۱۳). سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 به عنوان باکتری مرجع حساس به متی سیلین به منظور کنترل کیفی، صحت و دقت روش مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA: بعد از کشت شبانه باکتری در محیط LB براث (Lauria Bertani) در دمای ۳۷ درجه سیلسیون استخراج DNA به روش SDS-Proteinase K همراه با CTAB انجام شد (۱۵،۱۴).

انجام Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های مقاوم:

به منظور انجام Multiplex PCR و حصول اطمینان از وجود ژن های مورد مطالعه در سویه ها، ابتدا هر یک از ژن ها به طور انفرادی در دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, Japan) تکثیر شدند. سپس روش Multiplex PCR با تغییر در غلظت پرایمرها و $MgCl_2$ برای تکثیر ژن های *nuc* (16)، *femB* (2)، *mecA* (17) و *aac(6')/aph(2'')*-Ia (18) بکار گرفته شد. به طور خلاصه، مخلوط لازم جهت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۶ میلی مول $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر بافر PCR (10X)، 200 میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هر جفت پرایمر و در نهایت ۲/۵ واحد پلیمراز Taq تهیه گردید. همه موارد بجز پرایمرها (شرکت Sigma) از شرکت ایرانی سیناژن فراهم شد. مراحل مختلف تکثیر ژن های مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر شامل: واسرشتگی اولیه $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، بعد از آن $35^{\circ}C$ چرخه شامل واسرشتگی در $95^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه، اتصال در $54^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه، تکثیر $72^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه و تکثیر نهائی در $72^{\circ}C$ برای ۵ دقیقه صورت گرفت. محصولات بدست آمده از PCR با الکتروفورز بر روی ژل ۱٪، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و در زیر نور التراویوله مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وزن مولکولی قطعات از نشانگر مولکولی 100bp (GeneRuler™, Fermentas) استفاده شد. داده های بدست آمده از مطالعه با استفاده از روشهای آمار توصیفی (فراوانی - درصد) و با استفاده از نرم افزاری SPSS17 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها

از مجموع ۱۳۸۹ نمونه بالینی بررسی شده، تعداد ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس شامل زخم (n=۵۹)، خون (n=۱۱)، آبسه (n=۳)، مایعات بدن (n=۷)، لوله تراشه (n=۶) و بینی (n=۴)

(۵). در سال ۱۹۸۰ ظهور مقاومت استافیلوکوک اورئوس به متی سیلین (MRSA) موجب نگرانی عمده در سلامت عمومی گردید (۱). مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک اورئوس به طور اولیه از طریق افزایش تولید پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین به ویژه PBP_{2a} و همچنین PBP تغییر یافته با افینیتی پائین برای آنتی بیوتیک های بتالاکتام ایجاد می شود. ژن *mecA* به عنوان کد کننده PBP_{2a} برای مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک اورئوس قلمداد شده است (۱). آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی یکی از عوامل مهم باکتریسیدی قابل استفاده برای درمان بسیاری از عفونت های باکتریایی هستند (۶). آمینوگلیکوزیدها به طور معمول شامل یک حلقه آمینوسیکلات مرکزی ۲-داکسی استریتامین که قندهای آمینی یا در موقعیت ۴ و ۶ مانند جنتامایسین و یا در موقعیت ۴ و ۵ مانند نتومایسین و لیویدومایسین متصل می شود، این مولکول های کاتیونی اثرات آنتی بیوتیکی خود را با اتصال به زیر واحد s30 ریبوزومی و در نتیجه قطع ترجمه باکتری اعمال می کنند (۷). فعالیت باکتریسیدی و طیف اثر وسیع آمینوگلیکوزیدها، این داروها را برای درمان عفونت های بیمارستانی بسیار پر اهمیت کرده است (۶). مکانیسم اصلی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها غیرفعال سازی دارو توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی است (AMEs). آنزیم $AAC(6')/APH(2'')$ که به وسیله ژن *aac(6')/aph(2'')*-Ia کد می شود، موجب مقاومت در میان ایزوله های استافیلوکوکی نسبت به این دسته دارویی می شود و توسط پلاسمید حمل می گردد. آنزیم های دیگری مانند $APH(3')-III$ و $ANT(4')-I$ که به ترتیب توسط ژنهای *aph(3')-IIIa* و *ant(4')-Ia* رمزگذاری می شوند در گونه های استافیلوکوکی شناسایی شده است (۸، ۹). با در نظر گرفتن گسترش سریع مقاومت چند دارویی در بین سویه های استاف اورئوس که یک مشکل عمده در سلامت عمومی محسوب می شود و توجه به این که روش های فنوتیپی زمان بر بوده و اغلب خصوصیات فنوتیپی وابسته به شرایط رشد هستند، لزوم بکارگیری روش های مولکولی به واسطه دقت و سرعت بالا برای تشخیص مقاومت های آنتی بیوتیکی یک امر مهم و ضروری به نظر می رسد (۱۱،۱۰،۲). بر این اساس در این مطالعه، ضمن تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، اقدام به شناسایی همزمان ژن های *mecA* *nuc* *femB* به همراه ژن *aac(6')/aph(2'')*-Ia با روش Multiplex PCR شد تا راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت های MRSA و کنترل عفونت، در مرکز بیماریهای عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا صورت گیرد.

مواد و روش ها

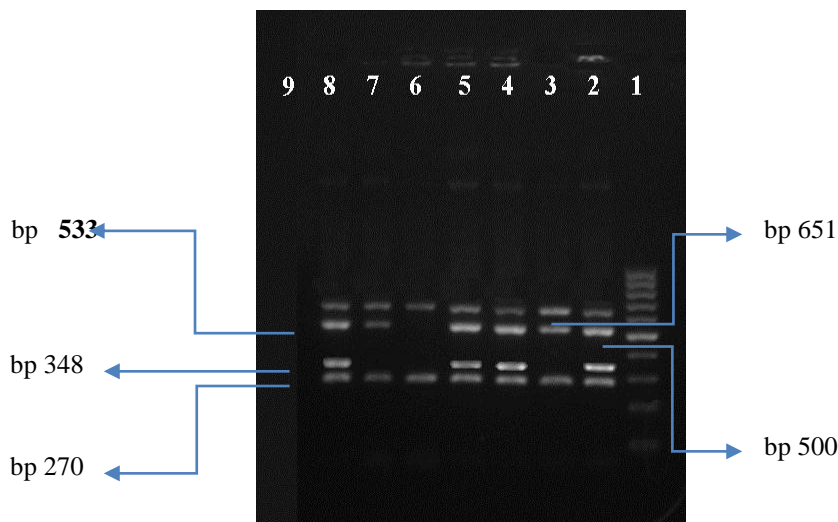
جمع آوری و شناسایی نمونه ها: در مطالعه حاضر، تعداد ۱۳۸۹ نمونه بالینی شامل زخم، خون، آبسه، مایعات بدن، لوله تراشه و بینی، از مراکز مختلف آموزشی - درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تبریز، در فاصله زمانی چهار ماهه (از اول آبان ماه تا اول اسفند ماه ۱۳۸۹) به صورت تصادفی جمع آوری شد و در آزمایشگاه مرکز بیماریهای عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا، از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی

مشاهده شد، که از این تعداد، ۳۴ سویه (۰/۷۷/۳) از سویه های MRSA و ۱۰ سویه (۰/۲۲/۷) مربوط به سویه های MSSA بود. نتایج ژل الکتروفورز برای ژن های مورد مطالعه در شکل یک نشان داده شده است. حضور ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* در عفونت های زخم، خون، مایعات بدن، لوله تراشه، آبسه و بینی به ترتیب ۵/۵۲٪، ۵/۴۵٪، ۹/۴۲٪، ۳/۳۳٪، ۳/۳۳٪ و ۵۰٪ می باشد. مقاومت به متی سیلین با استفاده از روش انتشار آگار از دیسک و روش PCR به ترتیب ۲/۷۲ درصد و ۴/۶۴ درصد به دست آمد. همچنین ۳ سویه در روش های فنوتیپی نسبت به آگراسیلین حساسیت داشتند ولی دارای ژن *mecA* بودند. در این مطالعه مقاومت به جنتامایسین در کل سویه ۹/۵۳ درصد با روش دیسک دیفیوژن به دست آمد و در روش مولکولی حضور ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* به میزان ۹/۴۸ درصد بود.

شناسایی گردید. نتایج تست های حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در جدول شماره ۱ آورده شده است. در این مطالعه روش Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و همزمان ژن های *aac(6') / aph(2'')-Ia* و *mecA.femB nuc* انجام گردید. هویت همه ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس غربال شده با روش های فنوتیپی با شناسایی ژن *nuc* قطعی شد. ژن مقاومت به متی سیلین (*mecA*⁺) در ۵۸ سویه (۴/۶۴ درصد) شناسایی شد که توزیع آن در سویه های بدست آمده از عفونت های زخم، خون، مایعات بدن، لوله تراشه و بینی به ترتیب ۸/۶۷٪، ۸/۸۱٪، ۹/۴۲٪، ۷/۶۶٪ و ۵۰٪ بود و این نوع مقاومت در سویه های جدا شده از آبسه مشاهده نگردید. ژن *femB* در ۸۶ سویه (۹۵/۶٪) استافیلوکوکوس اورئوس یافت شد که همه سویه های *mecA*⁺ را نیز شامل بودند. ژن عامل مقاومت به جنتامایسین *aac(6')/aph(2'')-Ia* در ۴۴ سویه (۴۸/۹٪) از کل سویه ها

جدول ۱: نتایج آنتی بیوگرام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شده با روش دیسک آگار دیفیوژن

آنتی بیوتیک ها	مقاوم (%) تعداد	مقاومت بینابینی تعداد (%)	حساس تعداد (%)
پنی سیلین	۸۸ (۹۷/۸)	-	۲ (۲/۲)
جنتامایسین	۴۸ (۵۳/۹)	-	۴۱ (۴۶/۱)
اریترومایسین	۶۲ (۷۱/۱)	-	۲۶ (۲۸/۹)
ونکومایسین	۱۱ (۱۲/۲)	-	۷۹ (۸۷/۸)
سیپروفلوکساسین	۵۸ (۶۴/۴)	۵ (۵/۶)	۲۷ (۳۰)
آگراسیلین	۶۵ (۷۲/۲)	۳ (۳/۳)	۲۲ (۲۴/۴)
سفوکسی تین	۶۳ (۷۰)	-	۲۷ (۳۰)
کلیندامایسین	۳۸ (۴۲/۲)	-	۵۲ (۵۷/۸)
ریفامپین سین	۱۶ (۱۸/۴)	۳ (۳/۳)	۷۱ (۷۸/۹)
لینوزولید	-	۳ (۳/۳)	۸۷ (۹۶/۷)
سلفازولین	۷ (۷/۸)	-	۸۳ (۹۲/۲)



شکل ۱: Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های *aac(6')/aph(2'')-Ia* و *mecA.femB nuc*

ستون ۱: نشانگر وزن ۱۰۰ bp ladder ستون ۲، ۴، ۵: سویه مثبت به *aac(6')/aph(2'')-Ia* و *mecA.femB nuc*

ستون ۳، ۷: سویه مثبت به *mecA.femB nuc* ستون ۶: سویه ATCC 29213 و مثبت به *femB nuc*

ستون ۹: کنترل منفی (فاقد DNA)

طول قطعات تکثیر یافته برای ژن های *aac(6')/aph(2'')-Ia* و *mecA.femB nuc* به ترتیب ۲۷۰، ۳۴۸، ۵۳۳، ۶۵۱، ۲۷۰ جفت باز بود.

بحث

اگرچه روش های فنوتیپی به طور معمول برای تشخیص استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین به کار گرفته می شود، ولی تشخیص ژن *mecA* به وسیله آزمایش PCR به عنوان روش استاندارد طلائی مطرح است، به ویژه آزمایش Multiplex-PCR که به طور همزمان چندین ژن را در یک واکنش منفرد به صورت سریع و قابل اطمینان تشخیص می دهد (۱۷-۱۹). در مطالعات متعددی استفاده از تکنیک Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک ها و تشخیص گونه های استافیلوکوک مطرح شده است (۲۰-۲۲). هم سو با این مطالعات، در مطالعه اخیر نیز روش Multiplex-PCR برای تشخیص استافیلوکوک اورئوس و ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک های متی سیلین و جتتامایسین بکار گرفته شد (شکل ۱). مطابق مطالعات صورت گرفته بر روی سویه های استافیلوکوک اورئوس، ژن *nuc* یک نوکلئاز مقاوم به حرارت خارج سلولی (thermonuclease) (TNase) تولید می کند که فراوانی مشابهی با سویه های تولید کننده کوگولاز دارد و بعنوان تست آنزیمی (تولید Tnase) در بسیاری از آزمایشگاه های میکروبیولوژی جهت شناسایی سویه های *S. aureus* به کار برده می شود (۲۳). در مطالعه حاضر نیز سویه هایی تولید کننده کوگولاز، همگی حامل ژن *nuc* بودند. ژن *femB* یک فاکتور ضروری برای مقاومت به متی سیلین را رمزگذاری می کند (۲). در این مطالعه همه سویه های *mecA*⁺ حامل ژن *femB* بودند که تأییدی بر ارتباط این دو ژن است.

مقاومت به متی سیلین در روش انتشار از دیسک و روش PCR به ترتیب ۷۲/۲ درصد و ۶۴/۴ درصد به دست آمد. از بین سویه هایی که در روش فنوتیپی انتشار از دیسک نسبت به اگراسیلین مقاوم بودند، تعداد ۱۲ سویه از لحاظ ژن *mecA* منفی بودند که این اختلاف می تواند ناشی از تولید بیش از حد آنزیم های پنی سیلیناز و یا پروتئین های اتصال دیگری به غیر از PBP_{2a} در سطح سلول باشد که به وسیله ژن هایی غیر از ژن *mecA* کد می شوند و تمایل این پروتئین ها در اتصال به اگراسیلین کم است (۲۴). همچنین ۳ سویه در روش های فنوتیپی نسبت به اگراسیلین حساسیت داشتند، ولی حامل ژن *mecA*⁺ بودند. در توجیه این مطلب گفته می شود که در برخی موارد استافیلوکوک ها نسبت به متی سیلین و اگراسیلین به صورت هتروژن مقاومت نشان می دهد و در این حالت در آزمایش های تعیین حساسیت گاهی به صورت حساس ظاهر می شوند چرا که ژن *mecA* به طور دائم بیان نمی شود در حالی که سویه ها ذاتا حامل این ژن مقاومت هستند (۲۴). جتتامایسین نقش مهمی در درمان عفونت های شدید استافیلوکوکی ایفا می کند و اغلب در ترکیب با یک بتالاکتام و یا یک گلیکوپپتید به ویژه در درمان اندوکاردیت های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۰). در این مطالعه، با روش دیسک دیفیوژن، مقاومت به جتتامایسین ۵۳/۹ درصد بر آورد شد درحالیکه با استفاده از ردیابی ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* این میزان ۴۸/۹ درصد بود. این اختلاف می تواند به دلیل حضور سایر ژن های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی یا مکانیسم های دیگری مانند کاهش نفوذپذیری و یا تغییر اهداف ریبوزومی باشد (۲۵). نظیر مطالعه ما، نتایج مطالعات از کشور ترکیه و کره حاکی از آن است

که ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* فراوان ترین (۶۶٪ و ۶۵٪) ژن کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AME) در سویه های بالینی است (۲۶ و ۱۰). در مقابل طی تحقیقی در ژاپن در سال ۲۰۰۱، ژن *ant(4')Ia* با فراوانی ۸۴/۵ درصد بیشترین عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها گزارش شد (۲۷). در مطالعه Choi 2003 و همکاران که با استفاده از PCR Multiplex صورت گرفت از ۴۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۵ سویه (۵۵/۶٪) دارای ژن *mecA* و بیشترین شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مربوط به ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* 9/68% بود (۹). در مطالعه حاضر همانند مطالعه Choi ارتباط معنی داری بین حضور ژن های *mecA* و *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* بدست آمد ($p < 0/05$). در سال ۲۰۰۳ Birgit و همکارانش نشان دادند که Multiplex-PCR یک روش سریع و دقیق برای غربالگری شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در مطالعات اپیدمیولوژیکی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس است، از این تکنیک برای تشخیص ژن های مقاوم به جتتامایسین و متی سیلین استفاده نمود، که از این میان ۹۳ درصد سویه ها دارای ژن *mecA* و ۶۳/۳ درصد دارای ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* بودند (۲۸). طی مطالعه ای که در ایران توسط فتح اله زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی ۱۰۹ ایزوله MRSA انجام شد ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* با فراوانی ۸۳ درصد بیشترین شیوع را در مقایسه با ژن های *ant(4')Ia* و *aph(3')IIIa* داشت (۲۹) که نظیر مطالعه ما، تأییدی بر وجود ارتباط بین این دو ژن است.

نتیجه گیری

با توجه به بروز مقاومت بالا در برابر آنتی بیوتیک های روتین در بین جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس، لزوم پایش و بررسی دقیق حساسیت آنتی بیوتیکی در آزمایشگاه امری ضروری است. نتایج تست های فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی مقاومت به متی سیلین، ضرورت توأم سازی روش های فوق را نشان داد. همچنین مشخص شد که حضور ژن *mecA* در بین سویه های جدا شده از عفونت های خون و مقاومت به ژن *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* در سویه های جدا شده از زخم بیشتر از سایر نمونه های بالینی است. در ضمن ارتباط معنی داری بین حضور همزمان ژن های *mecA* و *Ia-aph(2'')*-*aac(6')* وجود دارد. مطابق مطالعات صورت گرفته، با توجه به زمان بر بودن روش های فنوتیپی استفاده از تکنیک Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و دقیق ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک ها در آزمایشگاه های میکروبیولوژی مفید و ضروری است (۱۹).

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبی شناسی دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان است و هزینه آن توسط مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا در تبریز تامین شده است که می طلبد از زحمات جناب آقای دکتر بهروز نقیلی رئیس مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا تشکر و قدردانی به عمل آید.

References

- Krause K, Renelli M, Difuntorum S, Benton B. In Vitro Activity of Telavancin against Resistant Gram-Positive Bacteria. *Antimicrobial agents and chemo* 2008; **52**(7): 2647-2652.
- Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(11): 4037-4041.
- Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Anti Ag Chemother* 2000; **44**(7): 1771-1777.
- Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**(2): 178-182.
- Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Anti Ag* 2000; **16**(1): 3-10.
- Edson R, Terrell C. The aminoglycosides. *Mayo.C/in.Proc* 1991; **66**(1): 158-164.
- Davies JE. *Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes*. In *Antibiotics in Laboratory Medicine 3rd ed*. Williams &Wilkins, Baltimore, 1992; PP:691-713.
- Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cyto.* 2008; **46**(2): 225-228.
- Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci* 2003; **18**(5): 631-636.
- Nihonyanagi S, Kanoh Y, Okada K, Uozumi T, Kazuyama Y, Yamaguchi T. Clinical Usefulness of Multiplex PCR Lateral Flow in MRSA Detection: A Novel, Rapid Genetic Testing Method. *Inflammation* 2012; **35**(3): 927-934.
- Nunes EL, Dos Santos KR, Mondino PJ, Bastos MD, Giambiagide-Marval M. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **34**(2): 77-78.
- Forbes BA, Sahm DF. *Weissfeld AS. Bailey&Scotts Dia microbiology*. 12th ed. USA, Elsevier, 2007; PP: 172-213.
- Wayne, PA. *Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS*. 17th ef. USA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2007. CLSI/NCCLS document M100S17.
- Mahon L. *Text book of diagnostic microbiology*. 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2010; PP: 329-341.
- Mac Faddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore; Williams & Wilkins, 2002; PP: 51.
- Kuzma K, Malinowski E, Lassa H, Klossowska A. Specific detection of *Staphylococcus aureus* by PCR in intramammary infection. *Bul of the Vet Ins in Pulawy* 2003; **47**(1): 183-190.
- Nagi A, AL-Haj N, Amghalia E, Mariana N, Shamsudin Rasedee A. Novel Molecular Analysis for Characterization of Staphylococcal Cassette Chromosome in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Malaysian Hospital. *Res J Bio Sci* 2009; **4**(8): 937-942.
- Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner S. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Anti Ag Chemother* 2003; **47**(4): 1423-1426.
- Amghalia E, Nagi A, Al-Haj N, Mariana N, Son R, Rosli R, etal. Multiplex PCR Assays for the Detection of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Malaysian Hospitals. *Res J of Bio Sc* 2009; **4**(4): 444-448.
- 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): 138-163.
- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(11): 2864-2867.
- Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, BergeronMG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J Anti Chemother* 2000; **46**(4): 527-533.
- Brakstad O. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(7): 1654-1660.
- Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; **97**(3): 339-344.
- 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. *J of Med Microbiol* 1994; **41**(4): 282-290.
- 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.
- 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): 311-521.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiology* 2003; **41**(9): 4089-4094.
- Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M. Characterization of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrobial Agents* 2009; **33**(3): 2645.