

## مقاله تحقیقی

### بررسی پروفایل ژن های مقاومت *ermA,B,C* و *msrA* در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های اهواز

فاطمه عربگری<sup>۱</sup>، زهرا نورمحمدی<sup>۱\*</sup>، شهره زارع کاریزی<sup>۲</sup>، سحر هنرمند جهرمی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۰۹

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱۱

#### چکیده

در حال حاضر استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علت های اصلی عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. مطالعه حاضر به بررسی پروفایل ژن های کدکننده مقاومت به اریترومايسين در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی پرداخته است. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه بالینی بیماران شامل خون، ادرار، خلط و تراشه دارای استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان های اهواز جمع آوری گردیده است. مقاومت به آنتی بیوتیک های اریترومايسين، تتراسایکلین، پنی سیلین و کلیندامایسین با استفاده از آزمایش آنتی بیوگرام صورت گرفت. حضور چهار ژن کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل *ermA*، *B*، *C* و *msrA* در سویه های مورد مطالعه در ژنوم و پلاسمید استخراج شده با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، ۲۱ نمونه دارای ژن *ermC* جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی توالی یابی شدند. بررسی های مولکولی نشان داد که از میان ۶۴ نمونه مقاوم به اریترومايسين *ermA* ۸۷/۵٪، *ermB* ۹۳/۸٪، *ermC* ۹۲/۲٪ و *msrA* ۷۰/۳٪ بوده و همچنین ۲۵ نمونه حساس به اریترومايسين شامل *ermA* ۸۸٪، *ermB* ۹۲٪، *ermC* ۱۰۰٪ و *msrA* ۴۸٪ بوده است که به ترتیب با ارزش P و مقادیر ۰/۲۳، ۰/۶۶، ۰/۳۱ و ۰/۸۳ اختلاف معنی داری را بین نمونه های حساس و مقاوم به اریترومايسين نشان نداد. حضور این ژن ها در نمونه های حساس احتمالا می تواند به علت جهش در پروموتور یا ناحیه کد شده در منطقه ای از ژن ها باشد که مانع از عملکرد صحیح آن ها می گردد. همچنین نتایج حاصل از توالی یابی، حضور ژن *ermC* را بر روی پلاسمید اثبات نمود.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، ژن های *erm*، اریترومايسين، مقاومت آنتی بیوتیکی

#### مقدمه

گونه های اکتینومیسیت ها هستند. اریترومايسين، آنتی بیوتیک شاخص این گروه می باشد. دو مکانیسم مهم در مقاومت به ماکرولیدها وجود دارد که نوع مهم تر آن به واسطه تغییر در جایگاه هدف بوده که به واسطه ژن های *erm* کد شده و مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B (MLS<sub>B</sub>) را سبب می گردد و همچنین شامل یک سیستم پمپ برون ریز یا افلاکس است که در غشاء واقع شده و ژن های *msr*، *mef(A/E)* آن را کد نموده

گروهی از آنتی بیوتیک ها شامل ماکرولید، لینکوزامید و استرپتوگرامین B جزو آنتی بیوتیک های گروه MLS<sub>B</sub> می باشند. این گروه از داروها ساختار متفاوتی با هم داشته اما عملکرد یکسانی را در مقابل باکتری ها ایفا می کنند، به طوری که ساخت پروتئین باکتری را از طریق اتصال به 23SrRNA مهار می نمایند (۱-۳). ماکرولیدها محصول متابولیسم ثانویه بسیاری از

ایزوله های مورد مطالعه با روش multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، تتراسایکلین، متی سیلین و آمپی سیلین و نسبت کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نیتروفورانتوئین و ونکومایسین وجود داشت. بررسی مولکولی نشان دهنده حضور ۸۹٪ ژن *tetM* در سویه ه بود. نتایج حاصل از این تحقیق، مقاومت بالای آنتی بیوتیکی را در سویه های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس نشان می دهد.

مطالعه ای توسط Shaker و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، نمونه ها در طول سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲ آزمایشگاه های تشخیصی میکروبیولوژی از دو بیمارستان دولتی تخصصی عفونت های قفسه سینه جمع آوری شد تجزیه و تحلیل مولکولی سویه های مقاوم، حضور پلاسمیدها را در نمونه مورد آزمون نشان داد. آن ها استفاده از PCR، وجود ژن *erm* را در چهار نمونه و ژن *msrA* را در دو نمونه اثبات کردند (۱۰).

تحقیق حاضر به بررسی پروفایل ژن های مقاومت اریترومایسین شامل *ermA*، *ermB*، *ermC*، *msrA* در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی مختلف بیمارستانی پرداخته است. در این مطالعه، سعی شناسایی موقعیت این ژن ها بر روی ژنوم و پلاسمید شد است.

## مواد و روش ها

### جمع آوری نمونه

از بیماران بستری شده در بخش های مراقبت ویژه بخش عفونی بیمارستان های اهواز نمونه برداری با سواد پنبه ای استریل از زخم، بینی، زیر بغل، ناف، کشاله ران ادرار صورت پذیرفت. در کل ۱۰۰ نمونه جمع آوری شد در تمامی موارد، اطلاعات مربوط به سن، جنس و محل عفونت افراد ثبت شد. شناسایی سویه ها؛ استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی مانند رنگ آمیزی گرم و تست ها؛ بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز و کلونیزاسیون انجام گردید

و باعث خروج دارو از سلول باکتری می گردد (۴). ژن های *erm* مسئول کد کردن متیل ترانسفرازها می باشند. آنزیم های کد شده توسط این ژن ها سبب القاء دی متیلاسیون یک گروه آدنین (A2058/A2059) از دمین ۵ در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز زیرواحد 23S ریبوزومی شده که در نهایت باعث کاهش میل ترکیبی اتصال و ایجاد مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B (MLS<sub>B</sub>) می گردد. ژن های *erm* در بسیاری از ترانسپوزون ها شناسایی شده اند (۵). چهار وارپته از ژن های *erm* (erythromycin ribosome methylase) شامل *ermF*، *ermA*، *ermB*، *ermC* شناخته شده اند که می توانند مقاومت های دائمی (eMLS<sub>B</sub>) و القایی (iMLS<sub>B</sub>) را نسبت به داروهای گروه MLS<sub>B</sub> ایجاد کنند. ژن های *erm* با تولید آنزیم های متیلاز سبب متیلاسیون 23S rRNA شده و در نتیجه از اتصال آنتی بیوتیک به جایگاه ریبوزومی خود ممانعت نموده و از این طریق مقاومت های متقابل بین ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B ایجاد می نماید، بنابراین به آن فنوتیپ MLS<sub>B</sub> می گویند (۶).

تاکنون مطالعات مختلفی توسط گروه های تحقیقاتی در خصوص مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس صورت گرفته است. مطالعه ای توسط Zmantar و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت گوش و مایعات دیالیز صورت گرفت و ژن های مقاومت به اریترومایسین *ermA*، *ermB*، *ermC*، *msrA* و *mef* توسط Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفت که در آن فراوانی های مختلفی از وارپته های *erm* گزارش شد (۷). در تحقیق دیگری توسط همین گروه در سال ۲۰۱۳، مقاومت به اریترومایسین و اگزاسیلین در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از حفره بینی بیماران بستری در بخش کودکان مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به شاخص حداقل غلظت مهاری (MIC)، به ترتیب ۹۷ و ۹۸ درصد از نمونه ها نسبت به اگزاسیلین و اریترومایسین مقاومت نشان دادند (۸).

احمدی و همکاران (۹) استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت را از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری و زخم در بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه در سال ۱۳۹۱ جمع آوری کردند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها و حضور ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی شامل

### استخراج DNA ژنومی

باکتری بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و به منظور استخراج DNA کروموزومی از کیت سیناپور (Cinnapour, Cinnagen, Iran) مخصوص باکتری گرم مثبت طبق پروتکل شرکت استفاده شد. با استفاده از دستگاه نانودراپ، (Thermo Scientific, ONE C, USA) و ژل آگارز ۰/۰۸ درصد، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

### آنتی بیوگرام

آزمون آنتی بیوگرام برای بررسی میزان حساسیت باکتری به انواع آنتی بیوتیک ها صورت پذیرفت. برای هر آنتی بیوتیک قطر هاله ها اندازه گیری شده بود و بر اساس استانداردهای CLSI تجزیه و تحلیل گردیده بود.

### استخراج DNA پلاسمیدی

به منظور استخراج DNA پلاسمیدی توسط کیت GF-1 Plasmid DNA Extraction kit (RNase A included) از شرکت سیناکلون و کیت GeneJET™ Plasmid Maxiprep Kit و همچنین از دو روش دستی طبق پروتکل های ارائه شده توسط Birnboim & Doly

(۱۱) و Birnboim (۱۲) استفاده گردید. در نهایت بهترین روش (کیت GF-1 Plasmid DNA Extraction kit (RNase A included)) برای استخراج پلاسمید از تمامی نمونه ها صورت گرفت. کیفیت DNA پلاسمیدی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

### تکثیر ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی

برای شناسایی ژن های *erm* از آزمون PCR استفاده شد تا حضور ژن در استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به اریترومايسين مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق از یک جفت پرایمر برای شناسایی هر کدام از چهار واریته *erm* استفاده گردید. روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-RAD, GS800, USA) با شرایط بهینه-سازی شده طبق مراحل ارائه شده در ادامه انجام گرفت. همه پرایمرها توسط برنامه Gene Runner طراحی شدند و همچنین از پرایمر ۱۶S rRNA یونیورسال که مربوط به ژنی قرار گرفته تنها بر روی کروموزوم است به عنوان یک کنترل مثبت (وجود ژن) برای نمونه های کروموزومی و کنترل منفی (عدم وجود ژن) برای نمونه های پلاسمیدی استفاده شد. در جدول ۱ توالی پرایمرها نشان داده شده است.

جدول ۱ - توالی پرایمر برای ژن های *erm* و طول محصول PCR برای این قطعه.

نام ژن	توالی پرایمر	طول قطعه
<i>ermA</i>	5'-TAGTCTACACTTGGCTTAGGATG-3'	149 bp
	5'-TAGCTATCTTATCGTTGAGAAGG-3'	
<i>ermB</i>	5'-CTATCTGATTGTTGAAGAAGGAT-3'	146 bp
	5'-GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAA-3'	
<i>ermC</i>	5'-CTTGTTGATCACGATAATTTCC-3'	190 bp
	5'-ATCTATTAGCAAACCCGTATTC-3'	
<i>msrA</i>	5'-TATCCAATCAATGCACAAAATC-3'	166 bp
	5'-TCATTTCCCTCTATTTGGTGG-3'	
<i>16srDNA</i>	5'- GTAGGTGGCAAGCGTTACC 5'- CGCACATCAGCGTCAG	228 bp

dNTP، ۱/۶ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۳۳ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA انجام پذیرفت. برنامه حرارتی استفاده شده در این مرحله عبارت بود از: یک سیکل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵

در ابتدا برای تعیین خاستگاه ژن مربوطه از نظر پلاسمیدی و یا کروموزومی بودن، به کمک روش PCR، ژن ۱۶S rDNA در سوپه های میکروبی تکثیر گردید. در طی این مراحل، واکنش PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱x، ۰/۲۶ میلی مولار

SPSS ver.19 و PAST<sup>2</sup> آزمون (جدول توافقی) صورت پذیرفت. همچنین از نرم افزارهای Bioedit و MEGA4 برای توالی ها و هم‌تاسازی استفاده شده و توالی های بدست آمده از تعیین توالی با Basic Local Alignment Search Tool در NCBI به منظور تایید صحت آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

بر اساس استانداردهای باکتری شناسی CLSI در تست آنتی بیوگرام انجام شده از میان ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس، ۶۴ نمونه مقاوم نسبت به اریترومايسين بودند و بیشترین تعداد نمونه متعلق به نمونه های ادرار بود. همچنین ۲۶ نمونه حساس به اریترومايسين و متعلق به خون بوده و تعداد ۱۰ نمونه نیمه حساس به اریترومايسين هم متعلق به ادرار بودند (جدول ۲ و شکل ۱). در این مطالعه جهت تعیین تایپینگ سویه های مقاوم به اریترومايسين، ژن های مقاومت *ermA,B,C* و *msrA* مورد بررسی قرار گرفتند (اشکال ۲ و ۳). نتایج، حضور باند ۲۵۶ جفت بازی را بر روی ژل الکتروفورز در مقایسه با لدر ۵۰bp در تمامی نمونه های پلاسمیدی نشان داد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می گردد حضور باندهای ناشی از محصولات تکثیر ژن 16S rDNA در برابر نشانگر ملکولی (لدر) با اندازه ۵۰bp برای هر سه ستون نمونه گذاری شده مشخص می باشد و ستون چهارم نیز همان گونه که در شکل مذکور مشخص شده، مربوط به کنترل منفی است (فاقد DNA).

سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت به منظور تکمیل مرحله طویل شدن زنجیره نمونه ها در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. واکنش PCR برای تشخیص ژن های *ermA,B,C* و *msrA* بر روی DNA استخراج شده از پلاسمید و کروموزوم با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر همانند پروتکل و همچنین برنامه دمایی ارایه شده در بالا انجام شد. در این آزمایشات از کنترل منفی (No DNA) و کنترل مثبت (نمونه دارای ژن) به منظور بررسی کیفی محصول PCR و صحت انجام PCR، محصولات روی ژل آگارز ۲/۵ درصد بارگذاری و سپس با رنگ سایبرگرین ژل رد رنگ آمیزی شد. قطعات DNA به کمک دستگاه UV-doc مشاهده و عکس برداری شدند.

### توالی یابی نمونه ها

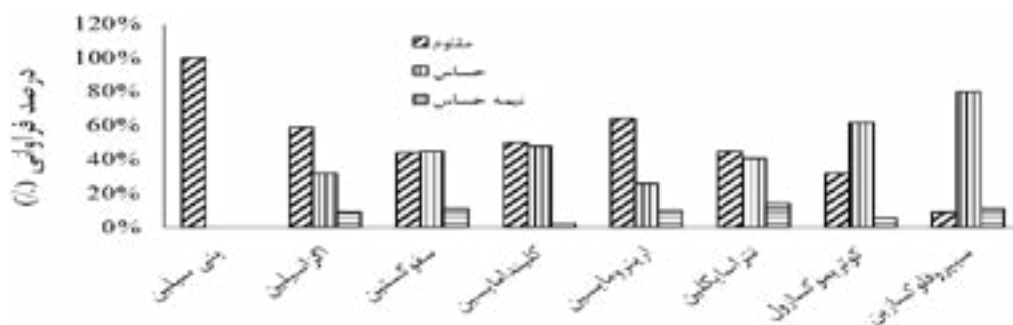
به منظور بررسی توالی ژن *ermC*، در مجموع ۲۱ نمونه دارای ژن *ermC* شامل ۷ نمونه خون، ۶ نمونه ادرار، ۴ نمونه تراشه و ۴ نمونه خلط انتخاب گردید. محصولات تکثیر ژن جهت توالی یابی به شرکت فناوری کوثر فرستاده شدند.

### آزمون آماری

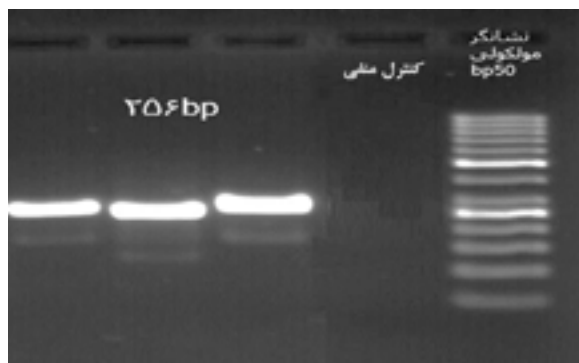
بررسی ارتباط ژن های *ermA,B,C* و *msrA* مربوط به مقاومت در برابر اریترومايسين در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از نرم افزار آماری

جدول ۲ - فراوانی سویه های مقاوم به اریترومايسين استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های بالینی.

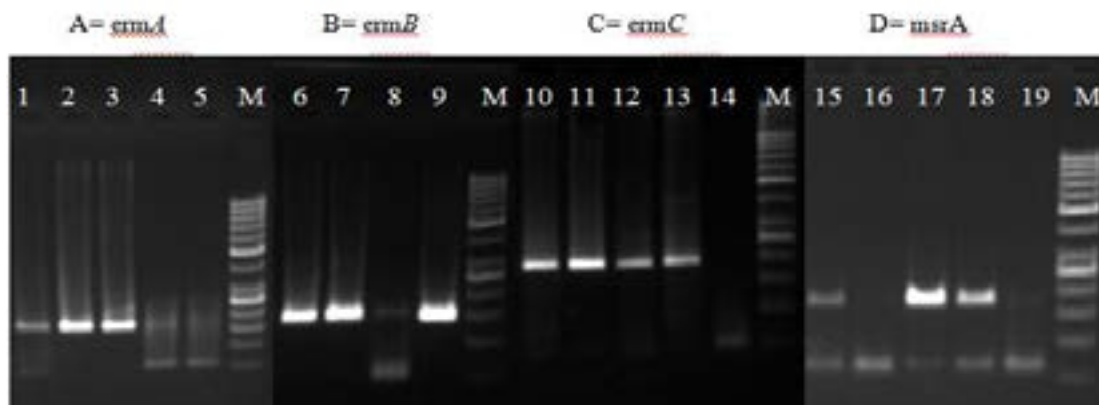
استافیلوکوکوس اورئوس	تعداد کل	ادرار	خون	تراشه	خلط
مقاوم	۶۴	۵۴	۱	۶	۳
حساس	۲۶	۷	۱۴	۲	۳
نیمه حساس	۱۰	۸	۲	۰	۰
تعداد کل	۱۰۰	۶۹	۱۷	۸	۶



شکل ۱ - نتایج تست آنتی بیوگرام استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بیماران.



شکل ۲ - ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن S rDNA ۱۶ با طول ۲۵۶ جفت باز.



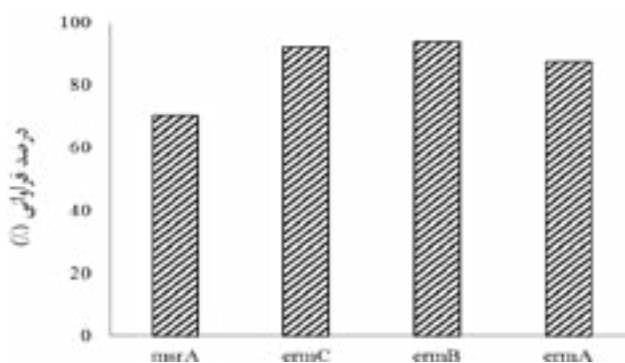
شکل ۳ - A: محصول PCR نمونه های بالینی ژن های *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*. شماره های ۱، ۲ و ۳ نمونه های دارای باند و شماره های ۴ و ۵ عدم ایجاد باند از نظر ژن *ermA*. B: نمونه های دارای باند از نظر ژن *ermB* (C): نمونه های دارای باند از نظر ژن *ermC* شماره های ۱۰ الی ۱۳ بوده و شماره ۱۴ نشان دهنده عدم ایجاد باند است. D: نمونه های دارای باند از نظر ژن *msrA* شماره های ۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ بوده و شماره های ۱۶ و ۱۹ نیز بیانگر عدم ایجاد باند برای ژن *msrA* M: DNA مارکر ۵۰ جفت بازی. لازم به ذکر است که به منظور تایید صحت تک تک مراحل کار، برای تمامی نمونه ها کنترل های مثبت و منفی نیز مورد استفاده قرار گرفته است.

کل تعداد ۲۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به اریترومايسين نیز، ۲۲ (۸۸٪) ایزوله دارای ژن *ermA* و در

از مجموع ۶۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومايسين، ۵۶ (۸۷/۵٪) ایزوله دارای ژن *ermA* از

حساس به اریترومایسین، ۱۰۰٪ ایزوله‌ها دارای ژن *ermC* و از مجموع ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس نیمه حساس به اریترومایسین، ۱۰۰٪ ایزوله‌ها نیز دارای این ژن بودند. ۷۰/۳٪ ایزوله‌ها دارای ژن *msrA* بوده به طوری که ۴۸٪ ایزوله‌های حساس به اریترومایسین و ۸۰٪ ایزوله‌های نیمه حساس دارای ژن *msrA* بودند. از میان ۶۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین، ژن *ermB* بیشترین (۹۳/۸ درصد) حضور را در نمونه‌های مقاوم داشته و بعد از آن بیشترین حضور متعلق به ژن *ermC* (۹۲/۲ درصد)، *ermA* (۸۵/۷ درصد) و *ermB* (۷۰/۳ درصد) بوده است (شکل ۴).

نهایت از مجموع ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس نیمه حساس به اریترومایسین، ۷۰٪ ایزوله دارای ژن *ermA* بودند. همچنین در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه، ۸۵/۹٪ دارای ژن *ermA* بودند. از کل نمونه‌ها، ۹۳/۸٪ ایزوله‌ها دارای ژن *ermB* و از مجموع ۲۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به اریترومایسین، ۹۲٪ ایزوله دارای ژن *ermB* و از مجموع ۱۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به اریترومایسین ۱۰۰٪ ایزوله دارای ژن *ermB* بودند. در خصوص فراوانی ژن *ermC* هم باید گفت که ۹۲/۲ درصد ایزوله‌ها دارای این ژن بود. از مجموع ۲۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۴ - درصد فراوانی حضور ژن‌های *ermA*, *B*, *C* و *msrA* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین.

درختچه مربوطه رسم گردید (شکل ۵). بر اساس این آنالیز، تمامی نمونه‌های مورد مطالعه ۱۰۰ درصد مشابه و با تفاوت بین ۰/۱ تا ۰/۰۵ با توالی‌های وارسته‌های مختلف ژن *ermC* پلاسمیدی ثبت شده در پایگاه قرار گرفتند.

#### بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن به دلیل حدت ذاتی آن از بزرگترین نگرانی‌ها است، زیرا توانایی ایجاد مجموعه‌ای از عفونت‌های متنوع تهدیدکننده زندگی و همچنین ظرفیت انطباق با شرایط مختلف محیطی را دارد (۱۳، ۱۴). باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس زمانی که در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های موثر قرار می‌گیرند، در حدود ۲۰ تا

#### نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن *ermC*

نتایج تکثیر توالی 16srDNA نشان از ناکارآمد بودن روش‌های مختلف استخراج پلاسمید به طور خالص از نمونه‌ها داشت. به منظور اطمینان از پلاسمیدی بودن ژن *ermC*، توالی‌یابی و هم‌ردیفی در پایگاه NCBI (Basic Local Alignment Search Tool) انجام گردید. نتایج به دست آمده، حاکی از پلاسمیدی بودن ژن *ermC* در نمونه‌های مورد مطالعه بود. توالی‌های ثبت شده ژن *ermC* از ایزوله‌های مختلف دنیا از بانک اطلاعاتی NCBI تهیه و با توالی‌های حاصله از نمونه‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار MEGA ver.4 با الگوریتم Clustal W هم‌تناسازی شدند. ماتریکس فاصله ژنتیکی نمونه‌ها محاسبه و از روش Neighbor Joining

مقاومت ساختاری و یا القایی به اریترومايسين بوده و به طورکلی در پلاسمیدهای کوچک واقع شده است (۱۶،۱۷). سویه های استافیلوکوک مقاوم به ماکرولیدها و استرپتوگرامین نوع B اغلب دارای یک جایگاه برای ژن *msrA* هستند که کدکننده یک پمپ جریان با واسطه ATP می باشند (۱۷). در بسیاری از موارد مشاهده شده است که مقاومت در برابر اریترومايسين با مقاومت در برابر سایر ماکرولیدها همچون لینکوزآمیدها و استرپتوگرامین B همراه است (۱۸). مقاومت در برابر اریترومايسين در استافیلوکوکس اورئوس، زیرمجموعه ای از فنوتیپ مقاومت در برابر ماکرولیدها، لینکوزآمیدها و استرپتوگرامین B است.

۴۰ درصد آن ها زنده باقی می ماند. در حال حاضر استافیلوکوکس اورئوس علت اصلی عفونت های بیمارستانی بوده و از آنجایی که بیماران بیشتری در خارج از بیمارستان درمان می شوند، نگرانی افزایش عفونت حاصل از آن در جامعه وجود دارد (۱۵،۱۶).

مقاومت به آنتی بیوتیک اریترومايسين در استافیلوکوک عمدتاً به واسطه متیلاز مقاوم در برابر اریترومايسين کدگذاری شده توسط ژن های *erm* است (۱۷). ژن *ermA* القایی در ترانسپوزون Tn554 یافت شده و تنها دارای یک جایگاه خاص برای درج در کروموزوم استافیلوکوکس اورئوس است (۲). ژن *ermB* در ترانسپوزون Tn551 از یک پلاسمید دارای ژن مقاومت به پنی سیلین دریافت شده است (۱۵). ژن *ermC* مسئول



شکل ۵ - دندروگرام Neighbor joining توالی های ژن *ermC* مربوط به ۲۱ نمونه مورد مطالعه و توالی های *ermC* پلاسمیدی ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI.



مقاومت بالاتر ( $MIC > 1024 \mu\text{g/ml}$ )، تجمع اریترومایسین بیشتری نیز در خارج از سلول وجود داشته است (۲۳).

بیان ژن های *erm* می تواند به صورت القایی ساختاری باشد. القای بیان ژن های *erm* در سطح پس رونویسی، شامل یک ساختار بالادست ژن *erm* بوده که توسط یک پپتید رهبر و یک سری از تکرارهای معکوس کنترل می گردد. تشکیل ساختارهای ثانویه مختل mRNA و ترجمه ژن *erm* در این منطقه تنظیمی؛ حضور یا عدم حضور یک القاء کننده و یا مهارکننده بستگی دارد. تنها ماکرولیدهای ۱۴ و ۱۵ عضوی می توانند بیا، ژن *erm* را القاء نمایند، در حالی که ماکرولیدهای ۶ عضوی، لینکوزآمیدها و استرپتوگرامین ها، قادر به القای بیان ژن *erm* نمی باشند (۲۴). علاوه بر این، مطالعات قبلی نشان داد که بیان ساختاری ژن های *erm* می تواند به سرعت و به صورت برگشت ناپذیری تحت فشار انتخاب و با توجه به تغییرات ساختاری (حذف توالی مختلف، تکرار و جهش) تغییر نموده و باعث شود که استافیلوکوک نسبت به همه آنتی بیوتیک های ماکرولیدی ۱۴، ۱۵ و ۶ عضوی لینکوزآمیدها و استرپتوگرامین B مقاوم شوند (۲۵، ۲۶). بنابراین، نتیجه گیری می شود که بازآرای ساختاری متفاوت در ساختار mRNA و یا تغییرات ساختاری (حذف، تکرار و یا جهش) در منطقه تنظیم کننده بالادست ژن *erm* می تواند یکی از دلایل قابل قبولی برای مکانیزم مقاومت در ایزوله ها باشد.

در مطالعه دیگری که توسط Zmantar و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت پذیرفت (۷) مواردی از قبیل استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت گوش (تعداد ۴۶) و استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (۷۱ نمونه)، ۲ ایزوله جدا شده از مایعات دیالیز و ۴۹ مورد جدا شده سوزن کشت باکتری مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژن مقاومت به اریترومایسین در استافیلوکوکوس اورئوس ۷/ درصد *ermA*، ۱۳/۷ درصد *ermB*، ۶/ درصد *ermC* و ۰/۲ درصد *msrA* بوده است. علاوه بر این، تعدادی از ایزوله های مثبت که به صورت کاتالاز منفی بوده، به ترتیب دارای ۹/۴ درصد *ermA*، ۱۱/۱ درصد *ermB*، ۷/۴ درصد *ermC* و ۴۱/ درصد *msrA* بوده اند. در این تحقیق میزان *ermB* بیشترین میزان فراوانی را در بین ژن ها؛

در واقع آنچه که در این مطالعه مشاهده گردید عدم تطابق کامل میان حساسیت فنوتیپی و حضور ژن های *erm* بوده است، چرا که بسیاری از ژن های *erm* در نمونه های حساس به اریترومایسین نیز وجود داشته اند. در مطالعه ای که توسط Zmantar و همکارانش صورت گرفته بود نیز به همین مورد اشاره شده است و از دلایلی که آنها اظهار داشتند این بود که این ناهماهنگی ممکن است به علت جهش در پروموتور و یا ناحیه کد شده در منطقه ای از ژن ها باشد (۷). در مطالعه ای که توسط Longping و همکارانش در سال ۲۰۱۵ صورت گرفته بود، دلایل ناشناخته ای را برای این امر بیان نموده است (۱۹). طی مطالعاتی که توسط چندین گروه پژوهشی انجام شده است مکانیسم های مقاومت به ماکرولیدها در استافیلوکوکوس اورئوس را طی دو مکانیسم با جهشی در زیرواحد rRNA ۲۳s و نیز با غیرفعال سازی آنزیمی توسط فسفوترانسفرازکد شده توسط ژن *mph(C)* مرتبط می دانستند (۲۰-۲۲). گروه تحقیقاتی Piątkowska و همکارانش نشان دادند که از ۱۳٪ از ایزوله های مقاوم به اریترومایسین، هیچ کدام دارای ژن های *erm* و *msrA* نبوده، در حالی که دارای مقاومت به اریترومایسین بوده اند. در این مطالعه تاکید بر حضور مکانیسم های ناشناخته ای نمودند که باعث ایجاد مقاومت به اریترومایسین گردیده که این امر نشان می دهد که احتمالاً این ژن ها در مکانیسم اعطاء کننده چنان مقاومت بالایی ( $MIC > 1024 \mu\text{g/ml}$ ) دخالت ندارند (۲۳).

مطالعات بر روی ژن *msrA* نیز نشان داد که وجود این ژن باعث پمپ شدن اریترومایسین به خارج از سلول شده و از این طریق مقاومت نسبت به اریترومایسین را ایجاد می کند. طی مطالعه اخیر نشان داده شد که لزومی به وجود این ژن نیست و در واقع مکانیسم های دیگری هم می توانند وجود داشته باشند. در واقع در رابطه با نمونه هایی که ما حضور این ژن را نداریم، ژن های *erm* با همراهی مکانیسم های ناشناخته دیگر می توانند باعث مقاومت شوند و حتی فقط حضور این ژن و تحت تاثیر قرار دادن غشاء سلولی به تنهایی نمی تواند باعث مقاومت بیشتر شود و دیواره سلولی نقش مهم تری دارد، چرا که در مطالعه ای پیشین مشاهده شد که در نمونه های با



طور عمده شامل حضور *ermA* در استافیلوکوکوس اورئوس (۸۲/۵٪)، *ermB* در انتروکوک (۵۵٪) و *ermC* در سیستم عصبی مرکزی هم ۴۷/۲٪ بودند. این تحقیق در نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس نیز با مطالعه حاضر مطابقت نداشته و در این تحقیق میزان *ermA* بیشترین فراوانی را در بین نمونه های مقاوم داشته است.

در مطالعه ای که بر روی استافیلوکوکوس اورئوس در ترکیه انجام گردید، فراوانی ژن *ermA* ۳۳٪/۱ و ژن *ermB* ۵٪/۱ گزارش شد. از طرف دیگر، ۲۲٪ از استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن *ermC* بوده اند که نتایج ما از این منظر نیز متفاوت با مطالعه Ardıc و همکاران می باشد (۲۹).

در این تحقیق به بررسی چهار ژن مقاومت به اریترومیسین در استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته شد. نتایج به دست آمده از مقایسه نمونه های حساس با نمونه های مقاوم به اریترومیسین، تفاوت معنی داری مشاهده نشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته در جوامع مختلف و مقایسه آنها با مطالعه کنونی، می توان علت عدم معنی دار بودن حضور ژن ها در هر دو نمونه حساس و مقاوم به اریترومیسین را احتمالاً می توان به علت جهش در پرموتر و یا ناحیه کدشده در منطقه ای از ژنهادانست که با واکنش PCR شناسایی شده است. همچنین پس از انجام فرایند توالی یابی و طی هم ردیف سازی در NCBI (Basic Local Alignment search Tool) مشخص شد که توالی های ژن *ermC* متشابه توالی های موجود در پلاسمید می باشد که می تواند نشان دهنده تکثیر ژن *ermC* در پلاسمید باشد.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از واحد علوم و تحقیقات برای در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاریم.

#### References

1. Lin, C. F., Chung, T. C., 1999. Cloning of erythromycin-resistance determinants and replication origins from indigenous plasmids of *Lactobacillus reuteri* for potential use in construction of cloning vectors. *Plasmid* 42(1): 31-41.

دیگر به خود اختصاص داده و با مطالعه حاضر نیز همخوانی داشته است.

Zmantar و همکاران (۸) در سال ۲۰۱۳ نیز مقاومت به دو آنتی بیوتیک اریترومیسین و اگزاسیلین را در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. در این مطالعه در مجموع ۵۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از حفره بینی بیماران بستری در بخش کودکان، برای حساسیت به اگزاسیلین و اریترومیسین مورد بررسی قرار گرفتند. فراوانی ایزوله های مقاوم در برابر ژن های تست شده ۶۶ درصد *blaZ100. mecA* و نیز در مورد ژن های مورد بحث، ۱۵٪ *ermA*، ۳۰٪ *ermB*، ۲۲٪ *ermC* و ۳۶٪ *msrA* نشان داده شد. این مطالعه با درصد فراوانی- های تحقیقی که ما بر روی ژن های *erm* انجام داده ایم مطابقت نداشته به طوری که تحقیق حاضر درصد بالاتری را نشان داد.

مطالعه دیگری که توسط Zmantar و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی ۳۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت گوش انجام شد (۲۷). فراوانی ژن های مقاومت به اریترومیسین با درصدهای ۴۵/۷ *ermB*، ۱۷/۱ *ermC*، ۲۲/۸ *ermA*، ۲۸/۶ *msrA* مشاهده گردید. ژن *mef* در هیچ سوشی مشاهده نشد. همچنین هیچ گونه همبستگی بین روش های تعیین ژنوتیپ و فنوتیپ برای مقاومت در برابر اگزاسیلین و اریترومیسین یافت نگردید. بنابراین، در مطالعه مذکور نیز همانند پژوهش حاضر همبستگی بین روش های تعیین ژنوتیپ و فنوتیپ برای مقاومت در برابر اریترومیسین یافت نشده (۲۷) و همچنین در این تحقیق نیز *ermB* بیشترین میزان حضور را در بین نمونه های مقاوم از خود نشان داده است، ولی در مورد سایر ژن ها این طور نبوده و با مطالعه ی ما مطابقت نداشته است.

در مطالعه ای که توسط Lim و همکاران در سال ۲۰۰۲ صورت گرفت (۲۸). ژن های مرتبط با مقاومت به

2. Murphy, E., 1985. Nucleotide sequence of *erma*, a macrolide-lincosamide streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*: 633-640.
3. Projan, S. J., Monod, M., Narayanan, C. S., Dubnau, D., 1987. Replication properties of Pim13, a naturally occurring plasmid found in *Bacillus Subtilis*, and of its close relative

- Pe5, a plasmid native to *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 169(11): 5131-5139.
- Sutcliffe, J., Amelia, T. K., Wondrack, L., 1996. Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: A common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob. Agents Chemother 40(8): 1817-1824.
- Emanini, M., Aligholi, M., Aminshahi, M., 2008. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* isolates from hospitals in Tehran. Pol J Microbiol 57(2): 173-178.
- Eksi, F., Dogan Gayyurhan, E., Bayram, A., Karligil, T., 2011. Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Southeastern Turkey. J Microbiol Immunol Infect 44: 57-62.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Bakhrouf, A., 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. BMC Res Notes 4: 453.
- Zmantar, T., Bekir, K., Elgarsadi, S. I., Hadad, O., Bakhrouf, A., 2013. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity in pediatric service. Acad J 7(34): 4414-4421.
- Ahmadi, Z., Tajbakhsh, E., Momtaz, H., 2014. Determination of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. J Microbial World 6 (4):299-311.
- Shaker, A., AboshanabKh Mabrouk, A., Mohammad Hassouna, N., 2014. Plasmid-carried macrolides target site modification erm and efflux msr genes in some *Staphylococcus* spp. From lower respiratory tract infected patients. Acad J 5: 1-5.
- Birnboim, H. C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 7(6): 1513-1523.
- Birnboim, H., 1983. A rapid extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol 100: 243-255.
- Lowy, F. D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339(8): 520-532.
- Waldvogel, F. A., 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Vol. In Principles And Practice Of Infectious Diseases, Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania, USA. Pp. 2072-2083.
15. Bettin, A., Causil, C., Reyes, N., 2012. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. Infect 16(4): 329-334.
16. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., Beach, M., SENTRY Participants Group, 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and The Western Pacific Region for The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 32: 114-132.
17. Khan, S. A., Novick, R. P., 1980. Terminal nucleotide sequences of Tn 551 , a transposon specifying Erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Homology with Tn3. Plasmid 4(2): 148-154.
18. Lim, K., Hanifah, Y. A., Yusof, M., Thong, K. L., 2012. *ermA*, *ermC* , *tetM* and *tetK* are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. Indian J Med Microbiol 30: 203-207.
19. Longping, L., Feng, W., Zhang, Zh., Xue, H., Zhao, X., 2015. Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococcal isolates from *Bovine mastitis*. BMC Vet Res 11: 168-172.
20. Prunier, A. L., Malbrun, B., Tandé, D., Picard, B., Leclercq, R., 2002. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. Antimicrob. Agents Chemother 46(9): 3054-3056.
21. Wondrack, L., Massa, M., Yang, B. V., Sutcliffe, J., 1996. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob. Agents Chemother 40(4): 992-998.
22. Roberts, M., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Bogo Jensen, L., Rood, J., Seppala, H., 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide streptograminb resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother 43(12): 2823-2830.
23. Piątkowska, E., Piątkowski, J., Przondo-Mordarska, A., 2012. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. Cell Mol Biol Lett 17(4): 633-645.
24. Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P., 2007. Modes and

- modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev 20(1):79-114.
25. De Vries, L.E., Christensen, H., Agersø, Y., 2012. The diversity of inducible and constitutively expressed erm(C) genes and association to different replicon types in Staphylococci plasmids. - Mobile. Genet. Elem. 2(2): 72-80.
  26. Lühje, P., von Köckritzlickwede, M., Schwarz, S., 2007. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu* (A). J Antimicrobial Chemo 59: 600-606.
  27. Zmantar, T., Chaieb, K., Ben Abdallah, F., Ben Kahla-Nakbi, A., Ben Hassen, A., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2008. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. Folia Microbiol 53 (4): 357-362.
  28. Lim, J. A., Kwona, A. R., Kimb, S. K., Chongc, Y., Leec, K., Choia, E. C., 2002. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. Antimicrob Chemother 49 (3): 489-495.
  29. Ardic, N., Ozyurt, M., Sareyyupoglu, B., Haznedaroglut, T., 2005. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant Staphylococci. Intel J Antimicrobial 26:213-218.