شیوع ژن‌های کدکننده مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و استافیلوکوکوس کواگولاز منفی جداشده از عفونت‌های بیمارستانی

نوشین ابدال [۱](M.Sc)، احسان‌اله غزنوی راد [۲](Ph.D)، عادل حمیدی [۳](M.Sc)، سید داود حسینی [*۴](Ph.D)

۱- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروب‌شناسی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی*

۳- *موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی، اراک، بخش میکروب‌شناسی*

۴- *موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی، اراک، بخش مولکولی*

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس‌ها یکی از رایج‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌روند. آمینوگلیکوزیدها اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها در درمان اندوکاردیت و باکتریمی ناشی از استافیلوکوکوس‌ها استفاده می‌شوند. مکانیسم اصلی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس‌ها غیر فعال‌سازی دارو به وسیله آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی سلولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس کواگولاز منفی از نمونه‌های مختلف بالینی جمع‌آوری گردید و توسط تست‌های بیوشیمیایی استاندارد تعیین هویت شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و Etest برای آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی تعیین شد و سپس فراوانی ژن‌های (aac(6')-Ie-aph(2")، aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia با استفاده از روش PCR مشخص گردید.

یافته‌ها: ۲۶٪ از نمونه‌ها حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دادند. ژن‌های (aac(6')-Ie/aph(2" و aph(3')-IIIa به ترتیب فراوان‌ترین ژن‌ها بودند. حدود ۱۴٪ از کل نمونه‌ها به طور هم‌زمان دارای دو ژن فوق بودند ولی در هیچ نمونه‌ای ژن ant(4')-Ia یافت نشد.

نتیجه‌گیری: ژن‌های (aac(6')-Ie-aph(2" و aph(3')-IIIa شیوع بالایی در بین ایزوله‌ها داشتند، که با تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک می‌توان از شیوع مقاومت بیش‌تر جلوگیری نمود. استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به طور هم‌زمان اطلاعات کاملی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی را در اختیار ما قرار داد.

واژه‌های کلیدی: کوآگولاز، طلایی استافیلوکوک، واکنش زنجیره ای پلیمراز، آمینوگلیکوزیدها، متی سیلین

مقدمه

مقاومت به مواد ضد میکروبی به خصوص در میان پاتوژن‌های بیمارستانی یک مشکل رو به رشد جهانی شده است. استافیلوکوکوس‌ها یکی از رایج‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌روند [۲،۱]. از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها آمینوگلیکوزیدها هستند که اغلب به صورت ترکیب با بتالاکتام‌ها یا گلیکوپپتیدها، به دلیل عمل‌کرد سینرژیکی، در درمان اندوکاردیت و باکتریمی ناشی از استافیلوکوکوس‌ها استفاده می‌شوند [۳-۷]. این آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به زیرواحد S30 ریبوزوم سنتز پروتئین در باکتری را

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۶۸۷۱۴۰ نمابر: ۳۳۵۴۴۷۰۴ - ۰۸۶

Email: hosseinida@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۴

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

مهار می‌کنند [۷]. سه نوع مکانیسم مقاومت شامل تغییر در جایگاه اتصال دارو به ریبوزوم، کاهش در نفوذپذیری دارو و غیر فعال‌سازی آنزیمی دارو مسئول مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی می‌باشند [۸-۱۱] مکانیسم اصلی مقاومت آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس‌ها غیر فعال‌سازی دارو به وسیله آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی (Aminoglycoside modifying enzymes: AMEs) سلولی می‌باشد [۱۲-۱۵]. چندین لوکوس ژنی مجزا آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی را در استافیلوکوکوس‌ها کد می‌کنند. سه نوع آنزیم تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی در بین استافیلوکوکوس‌ها اهمیت ویژه‌ایی دارند که شامل AAC(6')/APH(2") ، ANT(4')-I و APH(3')-IIIمی‌باشد [۱۷،۱۶]. آنزیم AAC در گروه‌های آمینی و آنزیم‌های APH یاANT در گروه‌های هیدروکسیل آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی تغییر ایجاد می‌کنند [۵]. شیوع آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی در نواحی مختلف جهان متفاوت است [۱۱،۱۰]. در استافیلوکوکوس‌ها شایع‌ترین آنزیم تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی AAC(6')/APH(2")است که توسط ژن aac(6')-Ie-aph(2") کد می‌شود و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، توبرامایسین، کانامایسین، آمیکاسین و نئومایسین را غیر فعال می‌کند. آنزیم ANT(4')-Iتوسط ژن ant(4')-Ia کد شده و آنتی‌بیوتیک‌های نئومایسین، کانامایسین، توبرامایسین و آمیکاسین را غیر فعال می‌کند و نهایتاً آنزیم APH(3')-III که توسط ژن aph(3')-IIIa کد می‌شود و آنتی‌بیوتیک‌های نئومایسین، آمیکاسین و کانامایسین را غیر فعال می‌کند [۱۸-۲۱]. ژن aac(6')-Ie-aph(2")بر روی ترانسپوزون مرکبTn4001 قرار دارد، این ترانسپوزون در بین استافیلوکوکوس‌ها بسیار گسترش پیدا کرده است. این ترانسپوزون در خانواده پلاسمید pSK1 (پلاسمید کانژوگتیو مانند) pSK23 و گاهی اوقات روی پلاسمیدهای مقاوم به فلزات سنگین /بتالاکتامازها و مکان‌های مختلف کروموزومی یافت می‌شود. ژن aph(3')-IIIa روی ترانسپوزون Tn5405 حمل می‌شود که ممکن است در کروموزوم و پلاسمید قرار گرفته باشد. ژن ant(4')-Ia اغلب روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگتیو مانند pSK41 و در نهایت درون منطقه mec کروموزوم سویه‌های استافیلوکوکوس که احتمالاً نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه‌گری شده توسط Is257 است الحاق می‌شود. پلاسمید pUB110که ژن ant(4')-Ia را حمل می‌کند نیز درون ناحیه SCCmecIIملحق می‌شود [۲۲-۲۶]. مقاومت ژنتیکی به استرپتومایسین تا حدودی پیچیده‌تر است و با ژن‌های ant(6')-Ia،str، جهش‌های کروموزومی strA، aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia در ارتباط است [۲۷-۲۹]. هدف از این تحقیق بررسی فراوانی ژن‌های aac(6')-Ie-aph(2")، aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia در استافیلوکوکوس اورئوس‌های حساس به متی‌سیلین و استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی از طریق روش مولکولی PCR و مقایسه آن با روش‌های میکروبی استاندارد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری. این مطالعه از نوع مقطعی توصیفی بوده که در مدت زمان شهریور ۱۳۹۱ لغایت اردیبهشت ۱۳۹۲ صورت پذیرفته است، تعداد ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین (methicillin-sensitive*Staphylococcus aureus*: MSSA) و ۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی (coagulase-negative *staphylococci*: CoNS) شامل سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس [۲۸]، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس [۱۲]، استافیلوکوکوس لوگدونسیس [۵] و استافیلوکوکوس همولیتیکوس [۵] از نمونه‌های بالینی نظیر خون (۲۸٪)، زخم (۲۵٪)، ادرار (۱۸٪)، کاتتر (۴٪)، خلط (۱۳٪)، آبسه (۳٪)، مایع مفصلی (۳٪) و دیگر ترشحات (۶٪) از نمونه‌های بیمارانی که به مدت بیش ۴۸ ساعت از بستری شدنشان گذشته و به آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بیمارستان‌های شهر اراک ارسال گردیده است جمع‌آوری شده و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد از جمله رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط مانیتول نمک آگار، کاتالاز، DNase، کوآگولاز، تخمیر قندهای مختلف، تست اورنتین دکربوکسیلاز، اوره آز و تست حساسیت به دیسک (novobiocin ۵ µg) مطابق دستورالعمل‌های موجود شناسایی و تعیین هویت شده است [۳۰]. جهت تشخیص فنوتیپی نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین از دیسک‌سفوکسیتین (۳۰ µg) و اگزاسیلین (۱۰ µg) طبق دستورالعمل CLSI استفاده گردیده است [۳۱].

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی .تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی طبق روش انتشار از دیسک کربی- بائر (KirbyBauer Disk diffusion method) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی جنتامیسین ۱۰ µg (پادتن طب، ایران)، استرپتومایسین ۱۰ µg و نئومایسین ۳۰ µg (رشد، ایران) و با رعایت استانداردهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

شده است [۳۱] هم‌چنین برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) از آنتی‌بیوتیک جنتامیسین طبق روش Etest (Liofilchem, Italy) استفاده شده است. سویه‌های کنترل برای این آزمایش استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC12228 بوده‌اند [۳۲].

استخراج ژنوم. برای استخراج ژنوم ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر از باکتری کشت‌یافته در محیط کشت LB (Merk، آلمان) برداشته شده است و در لوله‌های ایندروف نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده است، سپس از پلیت‌های حاصله با استفاده از روش Salting out ژنوم استخراج گردیده است.

روش **Salting out**. به پلیت‌های حاصله ۵۰۰ µl از محلول Cell lysis buffer (1mM EDTA pH8, 10mM Tris-cl pH8, 0.1% SDS) (Merk, Germany) اضافه شده و پس از مخلوط شدن، ۵ µl لیزوزیم (Merk, Germany) روی آن ریخته شده و ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس از محلول شماره I (28.5ml H2O,5M Sodium acetate,11.5ml Glacial acetic acid) ۲۰۰ µl به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و سپس مایع‌رویی در تیوب دیگری ریخته شده و به آن ۷۰۰ µl ایزوپروپانول (Merk, Germany) اضافه گردیده و دوباره نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در انتها به رسوب باقی مانده ۷۰۰ µl اتانول ۷۵٪ (Merk, Germany) اضافه شده و به مدت زمان ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در نهایت ۲۰ µl از محلول Elution (Fermentas) به نمونه‌ها اضافه شده و با استفاده از دستگاه Nano drop (thermoScientific 2000) غلظت DNA نمونه‌ها مورد بررسی قرار داده شده است [۳۳].

روش مولکولی PCR.

به منظور شناسایی ژن‌های aac(6')-Ie-aph(2''), ant(4')-Ia و aph(3')-IIIa (سیناژن، ایران) از سه جفت آغازگر که توالی آن‌ها در جدول ۱آورده شده استفاده گردیده است [۱۴]. مخلوط نهایی واکنش در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۰/۷۵ میکرومول $MgCl_2$، ۱/۲۵ میکرولیتر PCR (10x) buffer، ۰/۴ میکرومول dNTPs، ۱ میکرومول از هر جفت آغازگر، ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ واحد DNA پلی‌مراز Taq (سیناژن، ایران) و در نهایت ۷/۹ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بوده است. سپس ویال‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio rad USA PCR C1000) قرار گرفته است. واسرشتگی اولیه در $95\ C^{\circ}$ به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشتگی در $95\ C^{\circ}$ به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرهای در $56\ C^{\circ}$ برای ژن aac(6')-Ie/aph(2'') و برای ژن‌های ant(4')-Ia و aph(3')-IIIa در $52\ C^{\circ}$ به مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر در $72\ C^{\circ}$ به مدت ۴۰ ثانیه و تکثیر نهایی در $72\ C^{\circ}$ به مدت ۱۰ دقیقه صورت پذیرفته است. محصول نهایی PCR بعد از اضافه شدن loading day بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از بافر تریس استات (۱×) به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شده است و در نهایت ایجاد باند به وسیله دستگاه UVI tec (Cambridge d5520N) مورد مطالعه قرار گرفته است. برای تعیین اندازه محصولات از یک نشانگر 100bp (GeneRuler ^{TM}, Fermentas) استفاده گردیده است. از نمونه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت برای ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدی استفاده شده است.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده و طول قطعه حاصل بعد از واکنش PCR

ژن هدف	توالی پرایمر (5' to 3')	سایز ژن	رفرنس
aac(6')/aph(2")	GAAGTACGCAGAAGAG ACATGGCAAGCTCTAGA	491 bp	14
aph(3')-IIIa	AAATACCGCTGCGTA CATACTCTTCCGAGCAA	242 bp	14
ant(4')-Ia	AATCGGTAGAAGCCCAA GCACCTGCCATTGCTA	135 bp	14

نتایج

از ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین مطابق روش انتشار از دیسک کربی- بائر ۱۴ (۲۸٪) سویه مقاوم به جنتامیسین، ۲ (۴٪) سویه مقاوم به استرپتومایسین و ۲ (۴٪) سویه مقاوم به نئومایسین بودند (جدول ۲) و از ۵۰ سویه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی ۷ (۱۴٪) سویه مقاوم به جنتامیسین، ۵ (۱۰٪) سویه مقاوم به استرپتومایسین و ۷ (۱۴٪) سویه مقاوم به نئومایسین بودند (جدول ۲). در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین مقاومت به هر سه آنتی‌بیوتیک دیده نشد ولی در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی در ۳ (۶٪) نمونه مشاهده گردید، پس سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطابق روش انتشار از دیسک کربی‌بائر در سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی نسبت به سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین بیش‌تر بوده است (جدول ۳). ۲۶٪ از ۱۰۰ نمونه شامل ۱۶/۵۰ (۳۲٪) استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین و ۱۰/۵۰ (۲۰٪) استافیلوکوکوس کواگولاز منفی حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دادند. بر اساس دستورالعمل CLSI میزان MIC≥۸ به عنوان سویه‌های مقاوم به جنتامیسین شناخته شده است.

بنابراین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین MIC بر اساس روش Etest برای سویه‌های مقاوم و نیمه حساس به جنتامیسین به‌دست آمده از روش انتشار از دیسک کربی-بائر به شرح زیر بوده است: ۴ سویه دارای (MIC≥۲۵۶µg/ml)، ۳ سویه (۱۲۸µg/ml)، ۴ سویه (۹۶µg/ml)، ۱ سویه (۶۴µg/ml)، ۱ سویه (۳۲µg/ml)، ۱ سویه (۱۶µg/ml) و در نهایت ۱ سویه (۲۴µg/ml، که این سویه در روش انتشار از دیسک کربی‌بائر نیمه‌حساس بوده است).

جدول ۲. الگوی حساسیت MSSA و CoNS به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی

نام گونه	تعداد	جنتامیسین			استرپتومایسین			نئومایسین		
		مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس
MSSA	۵۰	۱۴(٪۲۸)	۱(٪۲)	۳۵(٪۷۰)	۲(٪۴)	۴(٪۸)	۴۴(٪۸۸)	۲(٪۴)	۱(٪۲)	۴۷(٪۹۴)
CoNS	۵۰	۷(٪۱۴)	۲(٪۴)	۴۱(٪۸۲)	۵(٪۱۰)	۳(٪۶)	۴۲(٪۸۴)	۷(٪۱۴)	۴(٪۸)	۳۹(٪۷۸)

MSSA: Methicillin Sensitive S. aureus, CoNS: coagulase-negative staphylococci.

جدول ۳. حساسیت سویه های استافیلوکوکوس به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی با روش دیسک کربی بائر

نام گونه	تعداد	مقاومت سویه به ٪			حساسیت آنتی بیوتیکی	مقاومت آمینوگلیکوزیدی٪
		جنتامیسین	استرپتومایسین	نئومایسین		
MSSA	۵۰	۱۴(٪۲۸)	۲(٪۴)	۲(٪۴)	Gm^R, N^S, S^R	۱(٪۲)
					$Gm^R, N,^S S^I$	۹(٪۱۸)
					$Gm^R N,^I S^R$	۳(٪۶)
					Gm^S, N^S, S^S	۱(٪۲)
					$N,^S S^I$	۱(٪۲)
					Gm^S	۳۳(٪۶۶)
					$N,^R S^S$	۱(٪۲)
					Gm^I	۱(٪۲)
CoNS	۵۰	۷(٪۱۴)	۵(٪۱۰)	۷(٪۱۴)	Gm^R, N^R, S^R	۳(٪۶)
					Gm^R, N^R, S^S	۱(٪۲)
					Gm^R, N^S, S^S	۱(٪۲)
					$Gm^R, N,^I S^R$	۲(٪۴)
					Gm^S, N^R, S^S	۱(٪۲)
					Gm^S, N^R, S^I	۱(٪۲)
					Gm^S, N^S, S^I	۱(٪۲)
					Gm^S, N^I, S^S	۱(٪۲)
					Gm^S, N^S, S^I	۱(٪۲)
					Gm^I, N^R, S^S	۱(٪۲)
					Gm^I, N^I, S^I	۱(٪۲)
					Gm^S, N^S, S^S	۳۶(٪۷۲)

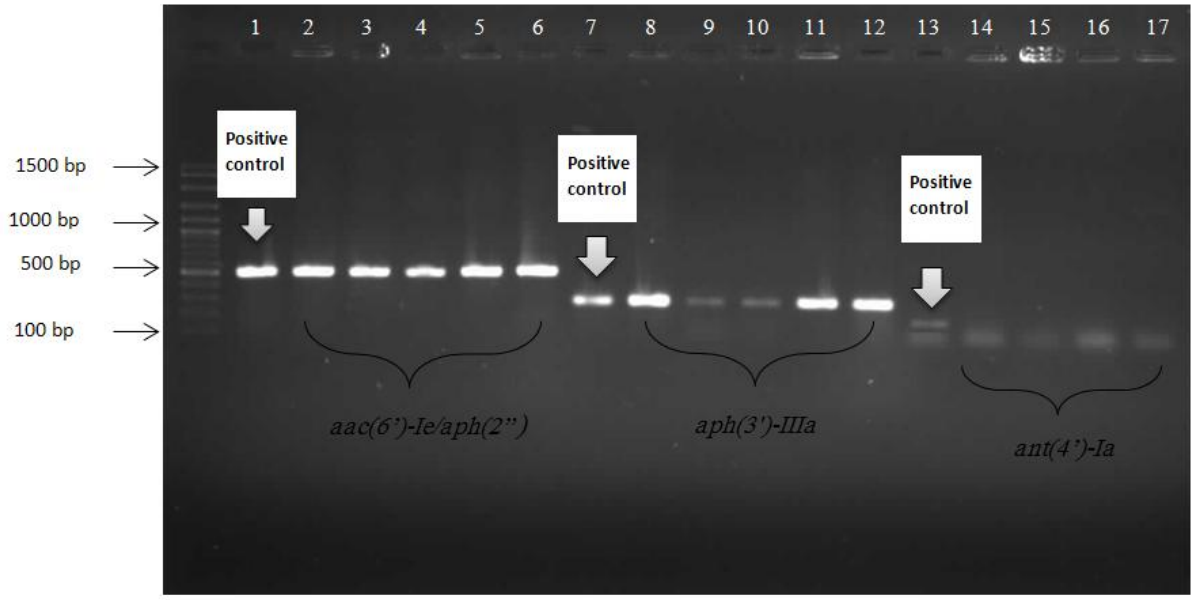
MSSA: Methicillin Sensitive S. aureus, CoNS: coagulase-negative staphylococci, Gm, gentamicin; N, Neomycin; S, Streptomycin. R, resistant; I, intermediate; S, sensitive to the antibiotic.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

جدول شماره۴- توزیع فراوانی ژن های مقاومت آمینوگلیکوزیدی درسویه های استافیلوکوکوس

نام گونه	aac(6')/aph(2")	aph(3')-IIIa	ant(4')-Ia	aph(3')-IIIa+aac(6')/aph(2")
MSSA	۴(٪۸)	۱(٪۲)	۰	۷(٪۱۴)
CoNS	۰	۲(٪۴)	۰	۷(٪۱۴)
جمع	۴(٪۸)	۳(٪۳)	۰	۱۴(٪۱۴)

MSSA: Methicillin Sensitive S. aureus, CoNS: coagulase-negative staphylococci



شکل۱: الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد برای محصول تکثیر یافته ژن(2")aac(6')-Ie/aph(قطعه جفت بازی۴۹۱)، ژنaph(3')-IIIa(قطعه جفت بازی۲۴۲) وژنant(4')-Ia(قطعه جفت بازی۱۳۵ که در مطالعه ما یافت نشد) به وسیله PCR. ردیف۱:کنترل مثبت ژن(2")aac(6')-Ie/aph(ATCC43300) ردیف ۷:کنترل مثبت ژن aph(3')-IIIa(ATCC43300) ردیف۱۳:کنترل مثبت ژنant(4')-Ia.

همچنین در سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی MIC سویه‌های مقاوم و نیمه‌حساس به جنتامیسین به دست آمده از روش انتشار از دیسک کربی-بائر به شرح زیر بوده است: ۴ سویه دارای (MIC≥۲۵۶µg/ml)، ۱ سویه (۳۲µg/ml)، ۱ سویه (۲۴µg/ml)، ۱ سویه (۱۶µg/ml) و در نهایت ۲ سویه (۴۸µg/ml، که این سویه‌ها در روش انتشار از دیسک کربی‌بائر نیمه‌حساس بوده‌اند). فراوانی ژن‌های aac(6')-Ie/aph(2")، aph(3')-IIIa و ant(4')-Ia برای سویه‌های استافیلوکوکوس مقاوم و نیمه‌حساس به جنتامیسین به روش PCR تعیین شد (شکل ۱). طبق نتایج حاصل در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین ۴ (٪۸) سویه ژن aac(6')/aph(2")، ۱ (٪۲) سویه ژن aph(3')-IIIa و ۷ (٪۱۴) سویه همزمان ژن aac(6')/aph(2")/aph(3')-IIIa را حمل می‌کردند، در ۳ سویه هیچ یک از سه ژن تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی یافت نشد. در سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی ۲ (٪۴) سویه ژن aph(3')-IIIa، ۷ (٪۱۴) سویه همزمان ژن aac(6')/aph(2") و aph(3')-IIIa را حمل می‌کردند در این سویه‌ها ژن aac(6')/aph(2") یافت نشد. همچنین در هیچ یک از سویه‌ها ژن ant(4')-Ia یافت نشد (جدول ۴). ژن aac(6')-Ie/aph(22") با فراوانی ۱۸٪ بالاترین میزان شیوع را در بین دو سویه مورد مطالعه داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

آمینوگلیکوزیدها با وجود داشتن سمیت کلیوی و سمیت شنوایی و مشکلاتی که در ارتباط با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به این داروها وجود دارد، همچنان در درمان عفونت‌های جدی استافیلوکوکی با ارزش هستند و نقش مهمی را در درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌ها بازی می‌کنند این آنتی‌بیوتیک‌ها از ویژگی‌های متعددی برخوردارند و به همین دلیل از آن‌ها به عنوان عوامل ضدمیکروبی مفید و با ارزش یاد می‌کنند. از میان این ویژگی‌ها می‌توان به فعالیت باکتری‌سیدالی وابسته به غلظت، اثر پس از مصرف آنتی‌بیوتیک (PAE: Post antibiotic effect) و آثار سینرژیکی آن‌ها با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها همچون بتالاکتام‌ها و گلیکوپپتیدها اشاره کرد. شایع‌ترین مکانیسم مقاومت مرتبط با آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی می‌باشد [۳۴-۳۷] که مقدار تولید آنزیمی، کارآمد بودن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

کاتالیزوری آنزیم و نوع آمینوگلیکوزید سطح مقاومت را در میکروارگانیسم‌ها و گونه‌های مختلف تعیین می‌کند [۱۰]. نتایج تحقیق ما نشان داد که به ترتیب میزان مقاومت به جنتامیسین، استرپتومایسین و نئومایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین ۲۸، ۴ و۴٪ می‌باشد. هم‌چنین میزان مقاومت به جنتامیسین، استرپتومایسین و نئومایسین به ترتیب در سویه‌های کواگولاز منفی ۱۴، ۱۰ و ۱۴٪ می‌باشد. هم‌چنین نتایج تحقیق ما نشان داد که ژن aac(6')-Ie/aph(2") بالاترین میزان شیوع را در بین دو سویه مورد مطالعه داشته است. بر اساس مطالعه‌ایی که در سال ۲۰۱۴ Sorour بر روی ۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین در مصر انجام داد میزان مقاومت به جنتامیسین برابر با ۳۴٪ بود که با نتایج ما در این بررسی تقریباً مطابقت داشت [۴۲] بر اساس مطالعه‌ایی که در سال ۲۰۱۲ bdour بر روی ۴۳ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین در عمان انجام داد میزان مقاومت به جنتامیسین برابر با ۳۲,۵٪ بود که با نتایج ما در این بررسی تقریباً مطابقت داشت [۳۸]. در طی بررسی که در سال ۲۰۰۳ Choi و همکارانش بر روی ۲۱ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین در کره انجام دادند میزان مقاومت به جنتامیسین برابر با ۵۲٪ بود که بیش‌تر از یافته‌های ما در این بررسی بود که نشانه مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک در کره می‌باشد [۱۴]. بر اساس مطالعه‌ایی که در سال ۲۰۰۹ یادگار و همکارانش در تهران بر روی ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین انجام دادند میزان مقاومت به جنتامیسین برابر با ۱۳,۴۶٪ بود که از یافته‌های ما در این بررسی کم‌تر می‌باشد که علت آن شاید به خاطر این باشد که از سایر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی بیش‌تر در تهران استفاده می‌شود [۳۹]. در بررسی که در سال ۲۰۰۰ در کویت توسط Eduo و همکارش بر روی ۱۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین انجام شد میزان مقاومت به استرپتومایسین و نئومایسین به ترتیب (۳٪، ۶٪) می‌باشد که با یافته‌های ما تقریباً مطابقت داشت [۳۲]. در مطالعه‌ایی که بر روی ۱۸۰ نمونه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی در سال ۲۰۰۴ در نروژ توسط Klingenberg و همکارانش انجام شد ۶۶٪ از نمونه‌ها به جنتامیسین مقاوم بودند که بسیار بیش‌تر از نتایج ما در این بررسی می‌باشد که دلیل بر مصرف غلط این آنتی‌بیوتیک در این منطقه می‌باشد [۴۳]. در مطالعه‌ایی که بر روی ۴۷ نمونه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی در سال ۲۰۰۳ در کره توسط Choi و همکارانش انجام شد ۶۳٪ از نمونه‌ها به جنتامیسین مقاوم بودند که بسیار بیش‌تر از یافته‌های ما در این بررسی می‌باشد که دلیل بر مصرف بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک در این منطقه می‌باشد. در بررسی که در سال ۱۹۹۹ در اروپا بر روی ۱۳۴ نمونه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی انجام شد میزان مقاومت به جنتامیسین برابر با ۳۳٪ بود که بیش‌تر از یافته‌های ما بود که نشانه مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک و استفاده مکرر از آن در اروپا می‌باشد [۱۹]. در بررسی که در سال ۱۹۹۹ در اروپا بر روی ۱۳۸ نمونه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی انجام شد میزان مقاومت به استرپتومایسین برابر با ۷٪ بود که با یافته‌های ما تقریباً مطابقت داشت که ممکن است به دلیل مصرف کم این آنتی‌بیوتیک در این مناطق باشد [۱۹]. ژن aac(6')-Ie/aph(2") با فراوانی ۱۸٪ بیش‌ترین شیوع را در میان سویه‌های مورد بررسی داشت که با توجه به نتایج به عمل آمده در کشورهای اروپا، کره، عمان و مصر برای (MSSA)، ترکیه و نروژ برای (CoNS) نیز مطابقت داشت [۴۳،۴۲،۴۰،۳۸،۱۹،۱۴] به دلیل آن که این ژن بر روی ترانسپوزون مرکب Tn4001 قرار دارد و در بین استافیلوکوکوس‌ها بسیار گسترش پیدا کرده است [۱۹]. دومین ژن غالب در این سویه‌ها aph(3')-IIIa بود که با نتایج به‌دست آمده در کره و مصر برای (MSSA) و در ترکیه برای (CoNS) مطابقت داشت [۴۲،۴۰،۱۴]. در واقع این ژن روی ترانسپوزون Tn5405 حمل می‌شود که ممکن است در کروموزوم و پلاسمید قرار گرفته باشد [۱۹]. ضمناً در نتایج حاصل ژن ant(4')-Ia در هیچ یک از دو سویه مشاهده نگردید که با توجه به نتایج به‌دست آمده در مصر برای (MSSA) کاملاً مطابقت داشت و در یونان نیز این مقدار برای (MSSA) نزدیک به صفر می‌باشد اما این ژن در کره، تهران برای (MSSA) و در نروژ برای (CoNs) بیش‌تر مشاهده گردیده است [۴۳،۴۱،۳۹،۱۴] یکی از دلایل عدم وجود این ژن در این تحقیق شاید به علت نبود ژن mecA باشد، این ژن اغلب روی پلاسمیدهای کوچک حمل می‌شود که این پلاسمیدها سپس به درون پلاسمیدهای کانژوگتیو مانند pSK41 و در نهایت درون منطقه mec کروموزوم سویه‌های استافیلوکوکوس که احتمالاً نتیجه حوادث نوترکیبی واسطه‌گری شده Is257 است الحاق می‌شود. پلاسمید pUB110 که ژن ant(4')-Ia را حمل می‌کند نیز درون ناحیه SCCmecII ملحق می‌شود و در واقع در پایین دست ژن mec قرار می‌گیرد [۳۹،۳۸]. در طی تحقیقی که در اراک بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (methicillin-resistant Staphylococcus aureus:MRSA) انجام شد مقدار این ژن ۱,۸٪ دیده شد که بیانگر این است مقدار این ژن حتی در سویه‌های MRSA در سطح اراک کم

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

می‌باشد [۴۴]. در ۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین هیچ یک از سه ژن تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی یافت نشد در صورتی که در روش دیسک کربی–بائر و Etest این سه سویه مقاوم شده بودند بنابراین مقاومت به جنتامیسین در این ایزوله‌ها به واسطه مکانیسم دیگری صورت می‌پذیرد [۱۷]. ترکیب دو ژن aac(6')-Ie/aph(2'') و aph(3')-IIIa در دو سویه مورد مطالعه (۱۴٪) مشاهده شد که نسبت به نتایج به‌دست آمده در کره کم‌تر بود [۱۴]. از ۱۰۰ نمونه ۲۶٪ حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دادند با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به موازات مصرف بالینی بیش از اندازه و بی‌رویه این داروها تشخیص سریع و به موقع سویه‌های مقاوم به منظور انتخاب گزینه‌های درمانی مناسب و جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به میزان بالای مقاومت سویه‌ها با مصرف به‌جا و تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک می‌توان از شیوع مقاومت بیش‌تر جلوگیری نمود. استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به طور هم‌زمان اطلاعات کاملی از مقاومت آمینوگلیکوزیدی را در مورد ایزوله‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران بخش میکروبی ومولکولی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی ایران شعبه مرکزی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر به عمل می‌آید. هم‌چنین از زحمات سرکار خانم مرضیه رنجبران که در شناسایی سویه‌های باکتریایی با ما همکاری داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2000; 16: 3-10.

[2] Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding 2 proteins and beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 361-385.

[3] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 430-450.

[4] Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Bolger AF, Levison ME, et al. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the young, and the councils on clinical cardiology, stroke, and cardiovascular surgery and anesthesia, american heart association: endorsed by the infectious diseases society of America. Circulation 2005; 111: 394-434.

[5] Cosgrove SE, Vigliani GA, Campion M, Fowler VG, Corey G, Abrutyn E, et al. Initial low-dose gentamicin for S. aureus bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. Clin Infect Dis 2009; 48: 713-721.

[6] Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 1998; 339: 520-532.

[7] Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices?. Int J Antimicrob Agents1997; 9: 1-19.

[8] Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1003-1012.

[9] Mingeot-LeclercqMP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 727-737.

[10] Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationship of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev 1993; 57: 138-163.

[11] Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms-combined results of surveys in eight regions of the world. J Chemother 1995; 7: 17-30.

[12] Nakaminami H, Noguchi N, Ikeda M, Hasui M, Sato M, Yamamoto S, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 273 exfoliativetoxin-encoding gene-positive Staphylococcus aureus isolates frompatients with impetigo in Japan. J Med Microbiol 2008; 57: 1251-1258.

[13] Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, et al. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from two hospitals in Tehran, Iran. Int J Antimicrob Agents 2009; 33: 264-265. (Persian).

[14] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, 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: 631-636.

[15] 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 Med Microbiol 1994; 41: 282-290.

[16] Kayser FH, Homberger F, Devaud M. Aminocyclitol modifying enzymes specified by chromosomal genes in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19: 766-772.

[17] Gray GS, Huang RT, Davies J. Aminocyclitol resistance in Staphylococcus aureus: presence of plasmids and aminocyclitol-modifying enzymes. Plasmid 1983; 9: 147-158.

[18] Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. Molecular analysis of a gentamicin resistance transposon like element on plasmids isolatedfrom North American staphylococcus aureus strains. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2106-2113.

[19] Shmitz 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. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 253-259.

[20] Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother 1990; 34 : 2164-2168.

[21] Courvalin P. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogram). Clin Microbiol Infect 1996; 2: 26-34.

[22] Stewart PR, Dubin DT, Chikramane SG, Inglis B, Matthews PR, Poston SM. IS257 and small plasmid insertions in the mec region of the chromosome of Staphylococcus aureus. Plasmid 1994; 31: 12-20.

[23] Archer GL, Niemeyer DM. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends Microbiol 1994; 2: 343-347.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

[24] Byrne ME, Gillespie MT, Skurray RA. 4′ ,4″ - adenyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from Staphylococcus aureus is encoded on an integrated copy of pUB110. Plasmid 1991; 25: 70-75.

[25] Derbise A, Dyke KG, Solh N. Characterization of a Staphylococcus aureus transposon Tn5405, located within Tn5404 carrying the aminoglycoside resistance genes, aphA-3 and aadE. Plasmid 1996; 35: 74-188.

[26] Udou T. Dissemination of nosocomial multiple-aminoglycoside resistant Staphylococcus aureus caused by horizontal transfer of the resistance determinant (aacA/aphD) and clonal spread of resistant strains. Am J Infect Control 2004; 32: 215-219.

[27] Phillips I, Shannon K. Aminoglycoside resistance. Br Med Bull 1984; 40: 28-35.

[28] Courvalin P, Fiandt M. Aminoglycoside-modifying enzymes of Staphylococcus aureus: expression in Escherichia coli. Gene 1980; 9: 247-269.

[29] Projan SJ, Moghazeh S, Novick RP. Nucleotide sequence of pS194, a streptomycin-resistance plasmid from Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res 1988; 16: 2179-2187.

[30] Saderi H, Olia P, Habibi M. Detection of mupirocin resistance in Staphylococcus aureus strains isolated from patients in four hospitals in Tehran University. J Daneshvar Med 2009; 16: 31-38.

[31] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard M2-A7 2005.

[32] Udo EE, Dashti AA. Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. Int J Antimicrob Agents 2000; 13: 273-279.

[33] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215-1215.

[34] Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. Int J Antimicrob Agents 1998; 10: 95-105.

[35] Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2977-2986.

[36] Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder RR. Vancomycin gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillinresistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1534-1535.

[37] Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. Curr Microbiol 2008; 56: 558-562.

[38] Bdour S. Heterogeneity of aminoglycoside resistance genes profile in clinical Staphylococcus aureus isolates. African J Microbiol Res 2012; 6: 5259-5265.

[39] Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. Microb Drug Resist 2009; 15: 109-113. (Persian).

[40] Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res 2012; 135: 389-396.

[41] Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, et al. Aminoglycoside-resistant staphylococci in Greece: prevalence and resistance mechanisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30: 701-705.

[42] Sorour AE, El-Awady BA, Mukhtar AM. Co-existance of aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes and mecA gene among nosocomial isolates of Staphylococcus aureus in surgical intensive care units in kasr Al-Ainy hospitals, Cairo University. Int Arabic J Antimicrob Agents 2013; 3: 1.

[43] Klingenberg C, Sundsfjord A, Ronnestad A, Mikalsen J, Gaustad P, Flaegstad T. Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989–2000. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 889-896.

[44] Guodarzi A, Zolfaghari MR, Rezazadeh M, Amouzandeh-Nobaveh A, Arjmandzadegan M, Ghaznavi-Rad E. Phenotypic and genotypic determination of aminoglycoside resistance in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from nosocomial infections. J Urmia Univ Med Sci 2014; 24: 883-893. (Persian).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive *Staphylococcus aurous* and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious

Noosheen Abdal (M.Sc)[1], Ehsanollah Ghaznavi-Rad (Ph.D)[2], Adel Hamidi (M.Sc)[3], Seyed Davood Hosseini (Ph.D)[*4]

1 - Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
2 - Dept. of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3 - Dept. of Microbiology Razi, Central Branch, Arak, Iran
4 - Dept. of Molecular Razi, Central Branch, Arak, Iran

(Received: 19 Nov 2013; Accepted: 19 Nov 2013)

Introduction: Staphylococci are the most common causes of nosocomial infections are considered. Aminoglycosides are often used in combination with B-lactamas and glycopeptides for the treatment of endocarditis and bacteremia caused by Staphylococci. The main mechanism of aminoglycoside resistance in staphylococci is drug inactivation by cellular aminoglycoside modifying enzymes.

Materials and Methods: 50 isolates of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus and 50 isolates coagulase-negative staphylococci, were collected from various clinical specimens and were identified by standard biochemical tests. The antibiotic susceptibility pattern of isolates using the disk diffusion method and Etest for determining aminoglycoside antibiotics and the frequency of gene aac(6')-Ie-aph(2''), aph(3')-IIIa and ant(4')-Ia was determined using PCR.

***Results*:** 26% of the samples showed resistance to at least one antibiotics.Genes aac(6')-Ie/aph(2'') and aph(3')-IIIa were most abundant genes, respectively. Approximately 14% of these genes were two samples simultaneously, but in no instance a gene ant(4')-Ia were found.

Conclusion: High prevalence of genes aac(6')-Ie-aph(2'') and aph(3')-IIIa resistance genes among isloate were found. Proper antibiotic can be prescribed to prevent dissemination of resistant strains. Use phenotypic and genotypic methods simultaneously give us full information of aminoglycoside resistance.

Keywords: Coagulase, Staphylococcus aureus, Polymerase chain reaction, Aminoglycosides, Methicillin

* Corresponding author. Fax: +98 86 33544704; Tel +98 9183687140
hosseinida@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

How to cite this article:
Abdal N, Ghaznavirad, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aurous and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. koomesh. 2014; 16 (1) :82-89
URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2229-1&slc_lang=en&sid=1