Arshive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤٣/هفته‌ی سوم مهر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

سنجش میزان بیان ژن‌های mecA و blaZ در سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین و تعیین ارتباط الگوی بیان ژنی آن‌ها

حامد طهماسبی[۱]، بهروز زینی[۲]، ساناز ده‌باشی[۳]، حمید معتمدی[۴]، مهسا وفایی‌فر[۴]، فریبا کرامت[۵]، محمدرضا عربستانی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاومت به بتالاکتام‌ها، از مهم‌ترین ویژگی‌های Staphylococcus aureus (S. aureus) به شمار می‌رود. این احتمال وجود دارد که میزان مقاومت در سویه‌های مقاوم و بیان ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی، در S. aureus متفاوت باشد. از این رو، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، تعیین میزان بیان ژن‌های mecA و blaZ در سویه‌های S. aureus مقاوم به متی‌سیلین و تعیین ارتباط الگوی بیان ژنی بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی- تحلیلی، ۱۲۰ ایزوله‌ی بالینی S. aureus مقاوم به متی‌سیلین با آزمایش‌های فنوتیپی از نمونه‌های بالینی مختلف، جداسازی شد. جهت بررسی کیفی ژن‌های mecA و blaZ در ایزوله‌های مقاوم، از روش Polymerase chain reaction (PCR) استفاده گردید. همچنین، جهت سنجش کمی ژن‌ها، از روش Real-time PCR مبتنی بر سایبرگرین ۱ استفاده شد. به منظور آنالیز داده‌های به دست آمده، از نرم‌افزارهای RG-REST و SPSS استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، از مجموع ۱۲۰ ایزوله‌ی S. aureus مقاوم به متی‌سیلین، ۱۰۵ ایزوله (۸۷/۵ درصد) دارای ژن blaZ بودند. در این بین، متنوع‌ترین تغییرات بیان ژنی مربوط به نمونه‌های خون و ادرار بود؛ به طوری که افزایش بیان در نمونه‌های خون و زخم و ادرار به میزان چشم‌گیری بیشتر از سایر نمونه‌های بالینی بود. همچنین، بین میزان بیان ژن mecA و blaZ در ایزوله‌های بالینی S. aureus و نمونه‌های بالینی مختلف، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش، مؤید عدم استفاده از دزهای مشابه آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از S. aureus در بخش‌های مختلف است.

واژگان کلیدی: بیان ژن، بتالاکتام، مقاومت دارویی، مقاومت به متی‌سیلین، Staphylococcus aureus

ارجاع: طهماسبی حامد، زینی بهروز، ده‌باشی ساناز، معتمدی حمید، وفایی‌فر مهسا، کرامت فریبا، عربستانی محمدرضا. **سنجش میزان بیان ژن‌های mecA و blaZ در سویه‌های Staphylococcus Aureus مقاوم به متی‌سیلین و تعیین ارتباط الگوی بیان ژنی آن‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۳): ۱۰۶۷-۱۰۶۲

مقدمه

عفونت‌های ناشی از Staphylococcus aureus (S. aureus) که از دامنه‌ی گسترده‌ای برخوردار هستند، با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی درمان می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی، گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند که نسبت به آنزیم‌های دخیل در ترانس‌پپتیداسیون پپتیدوگلیکان (Transpeptidation peptidoglycan) اثر مهاری دارند. مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در انواع Staphylococcus در دو دسته‌ی کلی تقسیم‌بندی می‌شود (۱).

اولین مورد غیر فعال کردن پنی‌سیلین به واسطه‌ی هیدرولیز، حلقه‌ی بتالاکتام می‌باشد. مورد دوم، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز ودیواره‌ی پروتئین Penicillin-binding proteins (PBPs) می‌باشد که سبب

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۵- استاد، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۶- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا عربستانی
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

www.SID.ir

Arshive of SID

کاهش تمایل به دارو شود و منجر به مقاومت وسیعی نسبت به پنی‌سیلین‌های نیمه‌سنتزی، سفالوسپورین‌ها و کربـاپنم‌هـا مـی‌شـود (۳-۲). بتالاکتامازها به طور انتخابی، حلقه‌ی بتالاکتام را باز می‌کنند؛ به نحوی که ساختار تغییر یافته‌ی دارو، نمی‌تواند اتصال مـؤثری بـا PBPs برقرار نمایـد. بنـابراین، اثـر تخریبـی بـر دیـواره‌ی سـلولی نخواهند داشت (۴). عـلاوه بـر ژن blaZ، حضـور ژن mecA نیـز می‌تواند سبب بروز مقاومت به طیف وسـیعی از بتالاکتـام‌هـا نظیـر متی‌سیلین و زمینه‌ساز ظهور سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین شود (۵). متی‌سیلین، از جمله آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی است که با اتصال به PBPs باعث مهار ترانس‌پپتیدازها، ممانعت از ساخت پپتیدوگلیکان باکتری و به دنبال آن، تخریب دیواره‌ی سلولی می‌شود و در نهایت، مرگ باکتری را در پی دارد (۶). از سال ۱۹۶۰ به بعد، مقاومـت بـه متی‌سـلین در بـین ایزولـه‌هـای بـالینی S. aureus مشـاهده شـد و زمینه‌ی ظهور سویه‌های جدیدی تحت عنوان «S. aureus مقاوم به متی‌سیلین» را رقم زد (۷).

ژن mecA منجر به بـروز S. aureus مقـاوم بـه متـی‌سـیلین می‌شود کـه بـر روی یـک کاسـت ژنتیکـی سـیار بـه نـام کاسـت کرومـــوزومی Staphylococcus mec قـــرار دارد (۹-۸). بیـــان ژن‌های عامل مقاومت به بتالاکتام‌هـا و متـی‌سـیلین، مـی‌توانـد در نمونه‌های بالینی مختلف، متفاوت باشد؛ بـه طـوری کـه بـا ایجـاد تفاوت در اعضای درگیر عفونت، می‌توان زمینه‌ی تغییـر در میـزان بیان ژن‌های mecA و blaZ را فراهم نمود (۱۰).

اسـتفاده از روش‌هـــای کمـــی وابســته بـــه Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction)، عـلاوه بـر ایـن کـه می‌تواند الگوی دقیق و سریعی را از نظر میزان فعالیت ژن در اختیار محقق بگذارد، دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشد (۱۰). ژن mecA بر روی کروموزوم و ژن blaZ بر روی پلاسمید حمل می‌شود. قرارگیری این ژن‌ها بـر روی ترانسـپوزون‌هـای Tn 552، Tn 4002 و Tn 4201، می‌تواند زمینه‌ی انتقال بین سویه‌ای و حتی بـین گونـه‌ای را فـراهم کنـد. ترشح آنزیم‌های بتالاکتاماز علاوه بر این که باعث ایجاد مقاومت بـاکتری در برابر داروهای گروه بتالاکتام می‌شود، از طرفی سبب ترشح زیاد آن در برخی سویه‌های فاقد ژن عامل مقاومت بـه متـی‌سـیلین و موجـب بـروز مقاومت کاذب (منفی کاذب) به متی‌سیلین می‌گردد (۱۱).

مطالعـه بـر روی blaZ نشـان داده اسـت کـه ایـن ژن، دارای بخش‌های ساختاری، سرکوبگر و یـک مبـدل سـیگنال مـی‌باشـد کـه توسط گروه‌های متفاوت bla کد می‌شوند (۲). با در نظر گرفتن موارد پیش‌گفته، هدف از انجام این مطالعـه، سـنجش میـزان بیـان ژن‌هـای mecA و blaZ در سویه‌های S. aureus مقاوم به متی‌سیلین و تعیین ارتباط الگوی بیان ژنی آن‌ها قرار داده شد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی که با اسـتفاده از روش نمونـه‌گیـری آسان و در دسترس انجام شد، طی یـک دوره‌ی ۹ ماهـه، ۳۷۲ نمونـه‌ی بالینی از بیماران بستری در بخش‌های مختلـف مراکـز درمـانی دانشـگاه علوم پزشکی همدان در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. بازه‌ی نمونه‌گیـری، ماه‌های خرداد تا دی و معیار ورود و خروج، مدت بستری بودن بیماران در بیمارستان تعیین شد. بـا اسـتفاده از روش‌هـای مبتنـی بـر کشـت و آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفتـه بـر روی ایزولـه‌هـای بـالینی، در نهایت ۱۸۸ ایزوله‌ی بالینی S. aureus جداسازی شد (۱۳-۱۲).

سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین و متی‌سیلین، با استفاده از دیسک‌های پنی‌سیلین ۱۰ واحدی و سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمـی (Mast, UK) بـا روش Kirby-Bauer disk diffusion تعیین گردید. برای کنترل کیفـی و ارزیـابی نتـایج، از Staphylococcus aureus ATCC25923 بـه عنـوان شـاهد منفـی و Staphylococcus aureus ATCC43300 بـه عنوان شاهد مثبت استفاده شد (۱۴).

اسـتخراج RNA Total بـا اسـتفاده از کیـت REboEx (شـرکت پیشگام، ایران) صورت گرفت و جهت سـنتز complementary DNA (cDNA) نیز از کیت سنتز (Eurx, USA) استفاده شد. مراحـل نهـایی کار، نظیر خلوص‌سـنجی RNA Total و cDNAهـای سـنتز شـده بـا توجه به مطالعات Ares صورت گرفت و محصولات سنتز شده، جهت آزمایش نهایی در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۵).

در این پژوهش، با استفاده از تکنیـک Real-time PCR، میـزان بیان Messenger RNA (mRNA) ژن‌های مورد نظر بـا روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ سایبرگرین ۱ ارزیابی گردید. میـزان تکثیـر در چرخه‌هایی که Cycle threshold (CT) نامیده مـی‌شـود، توسـط دسـتگاه ABI Step One Plus (Life Technologies, USA) صورت گرفت. در همه‌ی ژن‌های مورد بررسی، از ژن gmk به عنوان Gene house keeping استفاده شد (۱۷-۱۶).

جهـت بررسـی Efficiency و شرایط حاکم بر واکنش، نمـودار استاندارد رسـم گردیـد. محاســـبه‌ی بیـــان ژن‌هـا بـر اسـاس فرمول (-ΔCT) 1+Efficiency و مطالعـات Pfaffl method انجـام پذیرفت که در این بررسی، یک ژن مرجع (Reference) و یـک یـا چند ژن هدف (Target) وجود داشت (۱۸).

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Relative Quantitation و ΔΔtc، از نـــرم‌افـــزارهای RG-REST نسـخه‌ی ۲۰۰۸ و SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. از آزمـون آمـاری χ^2 بـرای مقایسـه‌ی یافتـه‌هـای کیفـی و از آزمـون Independent t برای مقایسه‌ی یافته‌های کمی استفاده گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Arshive of SID

یافته‌ها

از ۳۷۲ نمونه‌ی بالینی مختلف، ۱۲۰ ایزوله‌ی بالینی S. aureus مقاوم به متی‌سیلین و پنی‌سیلین جداسازی شد. در این بین، ۲۲ ایزوله (۱۸/۳۳ درصد) از زخم، ۱۶ ایزوله (۱۳/۳۸ درصد) از خون، ۵۴ ایزوله (۴۵/۰۰ درصد) از ادرار، ۱۱ ایزوله (۹/۱۶ درصد) از تراشه، ۱۴ ایزوله (۱۱/۶۶ درصد) از کاتاتر و ۳ ایزوله (۲/۶۰۶ درصد) از سواپ به دست آمد. با استفاده از روش Kirby-Bauer disk diffusion، از مجموع ۱۸۸ ایزوله‌ی بالینی S. aureus، ۱۲۰ ایزوله (۶۳/۸ درصد) مقاوم به متی‌سیلین و ۱۰۵ ایزوله (۸۷/۵ درصد) نیز مقاوم به پنی‌سیلین بودند.

در بررسی بیان ژن‌های mecA و blaZ، این ژن‌ها در نمونه‌های A12، A6، A4 و A3 دارای کاهش بیان بودند.

این نمونه‌ها که از تراشه و سواپ بینی و کاتاتر جدا شده بودند، با توجه به CTهای به دست آمده نسبت به ژن مرجع gmk، با کاهش چند برابری بیان نسبت به سایر نمونه‌ها همراه بودند. سایر نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه که از خون، ادرار و زخم بودند، همگی با افزایش میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه همراه بودند. ایزوله‌های A8، A9، A10 و A11 که همگی از نمونه‌های خون جدا شده بودند، دارای بیشترین بیان ژنی mecA و blaz بودند (جدول ۱).

نمودارهای مربوط به تکثیر دو ژن mecA و blaZ نشان دهنده‌ی فعالیت قابل توجه برخی از نمونه‌های بالینی در ΔRnهای بالا بود؛ به طوری که نمونه‌های جدا شده از زخم و خون، مقادیر بیشتری را از خود نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲).

بحث

تعیین بیان ژن‌های عامل مقاومت به متی‌سیلین و بتالاکتام‌ها در ایزوله‌های بالینی جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، الگوی متفاوتی را نشان داد. اطلاعات به دست آمده در این پژوهش، برای ژن mecA نمونه‌های بالینی مختلف شامل خون، ادرار، زخم و ترشحات نشان داد که بیان این ژن در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های خون و زخم، دارای بیشترین مقدار بیان خود بود.

در مطالعه‌ی مشابهی که Arede و همکاران در پرتغال (۱۹) و Chan و همکاران در چین (۱۶) انجام دادند، مشخص شد که میزان بیان ژن mecA می‌تواند تحت شرایط متفاوتی تغییر کند.

الگوی پراکنش سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین و متی‌سیلین در مطالعه‌ی حاضر، با نتایج مطالعات Chan و همکاران (۱۶) (با شیوع ۹۶ درصدی از ژن blaZ) مشابه بود (۱۶).

در مطالعه‌ی Robles و همکاران در کشور برزیل، ۹۲ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن blaZ بودند و مقاومت نسبت به سفازولین ۳۵ درصد گزارش شده بود (۱۷) که بیشتر از مقدار گزارش شده در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد.

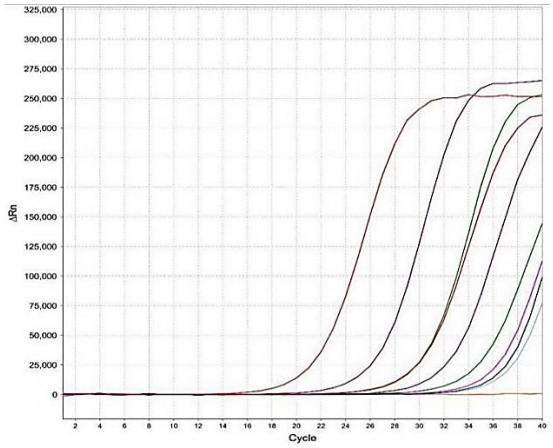
جدول ۱. اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار REST نسخه‌ی ۲۰۰۸ برای ژن‌های mecA و blaZ در ایزوله‌های بالینی Staphylococcus aureus

PCR efficiency	gmk gene	blaZ gene	mecA gene	$2^{-\Delta\Delta CT}$	
	۱/۰۹۰۰	۱/۰۲۹۰	۱/۱۲۰۰		
Ct values	Ct gmk	Ct blaZ	Ct mecA	fold induction blaZ	fold induction mecA
Control	۲۵/۰۴	۳۱/۴۳	۲۹/۰۵	۱	۱
A1	۳۴/۰۹	۲۹/۰۴	۳۵/۱۱	۳/۶۵۵۹۵۰۷۹	۱/۰۹۷۶۱۱۳۴۹
A2	۳۰/۸۷	۳۱/۸۸	۳۱/۴۳	۲/۸۸۸۹۹۸۰۳	۱/۲۶۱۹۹۴۸۶۹
A3	۲۲/۴۹	۳۳/۴۹	۲۸/۳۳	۲/۵۲۶۸۷۳۲۸۸	۰/۸۷۰۹۶۲۴
A4	۲۹/۰۷	۳۷/۷۷	۳۷/۷۷	۴/۸۴۷۶۹۸۶۱۹	۰/۵۲۶۸۰۲۲۵۹
A5	۳۴/۰۹	۳۵/۱۱	۳۵/۱۱	۸/۰۶۱۹۷۶۵۱۱	۱/۰۹۷۶۱۱۳۴۹
A6	۳۰/۹۸	۳۵/۴۸	۳۵/۴۸	۶/۱۰۱۷۰۸۱۵۱	۰/۸۰۵۰۸۴۵۸۶
A7	۳۰/۷۸	۳۱/۸۴	۳۱/۸۴	۶/۶۵۵۱۵۳۷۹	۱/۱۹۵۳۹۰۵۴۱
A8	۲۱/۷۸	۱۸/۰۹	۱۸/۰۹	۴/۵۳۹۷۴۰۳۸۳	۲/۶۱۴۶۸۳۶۱۴
A9	۲۹/۰۱	۲۸/۴۵	۲۸/۵۴	۶/۲۹۵۰۸۰۸۸۷	۱/۵۰۷۰۰۲۶۳۱
A10	۲۸/۰۴	۲۶/۰۶	۲۶/۰۶	۶/۱۹۹۶۹۵۴۷۲	۱/۸۱۷۳۶۱۷۴۳
A11	۱۹/۲۶	۱۷/۸۳	۱۷/۸۳	۳/۶۸۰۸۱۷۱۱۷	۲/۱۶۷۲۱۰۳۰۱
A12	۲۳/۵۸	۳۱/۸۹	۳۱/۸۹	۳/۵۷۳۲۷۵۸۳۱	۰/۶۳۹۱۱۳۷۰۲
A13	۲۱/۹۹	۲۳/۴۹	۲۳/۴۹	۳/۹۶۱۳۸۹۶۱	۱/۴۴۳۷۸۱۲۱۶
A14	۲۷/۳۳	۲۹/۱۳	۲۹/۱۳	۵/۳۴۱۷۳۵۰۵۳	۱/۲۰۷۱۷۲۲۳۶
A15	۴/۹۷	۷/۵۵	۷/۵۵	۱/۴۴۱۲۸۴۲۳۷	۲/۰۲۷۸۵۸۶۲۳

CT: Cycle threshold

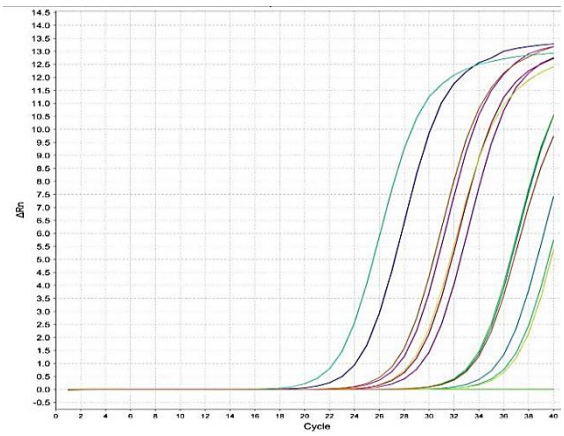
www.SID.ir

Arshive of SID



شکل ۱. منحنی حاصل از تکثیر موفقیت‌آمیز ژن mecA در نمونه‌های مختلف Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین. مقدار حد آستانه برای تمامی مراحل ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شده است.

در مطالعه‌ی حاضر نیز نمونه‌هایی که از عفونت‌های مختلف بیماران زن گرفته شده بود، الگوی رفتاری- ژنتیکی به مراتب متفاوتی داشتند. این امر، می‌تواند احتمال ارتباط حضور عوامل مرتبط با



شکل ۲. منحنی حاصل از تکثیر موفقیت‌آمیز ژن blaZ در ایزوله‌های مختلف Staphylococcus aureus مقاوم به پنی‌سیلین. مقدار حد آستانه برای تمامی مراحل ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شده است.

تفاوت‌های جنسیتی و دخالت این عوامل در میزان مقاومت را به میان بکشد که از این لحاظ، با یافته‌های مطالعه‌ی Arede و همکاران همسو می‌باشد (۱۹). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Arede و همکاران انجام شد، الگوی متفاوت‌تری از بیان و نقش عوامل متفاوت‌تری را مطرح کردند؛ به این صورت که در نمونه‌های دارای بیان افزایشی از نظر حضور ژن‌های دخیل در کد شدن ژن mecA مانند ژن‌های mecR، mecI و mecRI نیز دارای الگوی بیان متفاوتی بودند. در نمونه‌های A4، A6 و A12 که در این مطالعه بررسی شدند، کاهش بیان این ژن‌ها با هم بروز کرده است (۲۰). از این رو، نتایج حاصل، با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی پیش‌گفته (۲۰)، هم‌خوانی کامل دارد. اطلاعات حاصل از این مطالعه در مورد میزان بیان ژن blaZ در ایزوله‌های بالینی S. aureus مقاوم به بتالاکتام‌ها، مشخص کرد که ممکن است در برخی موارد، کاهش میزان بیان ژن mecA و blaZ یک سو نباشد.

در مطالعه‌ای که Pence و همکاران در آمریکا انجام دادند، مشخص شد که حضور و فعالیت ژن blaZ به عوامل مختلفی ارتباط دارد. یکی از این موارد را می‌توان میزان دز داروهای مصرفی برای از بین بردن عفونت ناشی از Staphylococcus دانست. این در حالی است که حضور برخی زیر واحدهای blaZ نیز می‌تواند در میزان بیان ژن mecA مؤثر باشد (۲۱). آنالیزهای آماری حاصل از این بررسی، نشان دهنده‌ی حضور یک ارتباط معنی‌دار بین نوع نمونه‌ی بالینی و ایزوله‌های جدا شده بود؛ به طوری که در همه‌ی نمونه‌های خون، ادرار و زخم که با بیشترین دز دارویی درمان می‌شدند، افزایش چند برابری ژن‌های mecA و blaZ مشاهده شد. در مطالعه‌ای که Lim و همکاران در استرالیا و انگلیس انجام دادند، مشخص شد که یکی دیگر از عوامل دخیل در بروز ژن mecA، عوامل محیطی و جغرافیایی می‌باشند؛ به طوری که این شرایط متفاوت، سبب ایجاد اختلاف در کاست ژنی mec شده است و با ایجاد جهش‌های مختلف در این قسمت، مقاومت‌هایی با تظاهرات خاص در سویه‌های S. aureus را می‌توان مشاهده کرد (۲۲).

از اطلاعات حاصل از این پژوهش، مشخص شد که بیان ژن blaZ که توسط پلاسمید قابلیت انتقال دارد، نسبت به ژن mecA که توسط یک کاست کروموزومی حمل می‌شود، به مراتب بیشتر است. این امر، نشان دهنده‌ی فعالیت بسیار قابل توجه ژن‌های پلاسمیدی در مقابل ژن‌های کروموزومی است. چنین موردی را می‌توان با توجه به الگوی ژن‌های نمونه‌های A3، A6 و A12 توجیه نمود؛ به گونه‌ای که در این نمونه‌ها که میزان بیان ژن mecA منفی بود، در کنار آن میزان بیان ژن blaZ دارای یک جهش چند برابری بود. نتایج همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر را می‌توان در مطالعات Uliczka و همکاران در کشور آلمان (۲۳) و نیز Bowers و همکاران در کشور آمریکا (۲۴) مشاهده کرد.

این مطالعه، نشان داد که ایزوله‌های S. aureus عامل عفونت در اندام‌های خاص مانند خون و دستگاه ادراری، که نیاز به دزهای بالای آنتی‌بیوتیک جهت درمان دارند، دارای الگوی بیانی متفاوتی بودند. این امر را باید با الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک و دزهای درمانی که نقش مؤثری بر حضور و فعالیت برخی ژن‌های پایه‌ای دارند، مرتبط دانست. همچنین، با توجه به محدودیت های بررسی حاضر، لازم است مطالعات بیشتری در زمینه‌ی اثبات ارتباط بین حضور و میزان بیان ژن‌های مختلف در ایزوله‌های گرفته شده از نمونه‌های بالینی مختلف، انجام شود.

www.SID.ir

Arshive of SID

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح هیأت علمی در سال ۱۳۹۵ به شماره‌ی ۹۵۱۰۱۴۵۹۶۲ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسید. نویسندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

References

1. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014; 27(4): 870-926.
2. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2006; 57(3): 450-60.
3. Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. Pediatr Infect Dis J 2005; 24(9): 817-22.
4. Raei F, Eftekhar F. Studying the presence of blaZ gene and b-lactamase production in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Iran J Med Microbiol. 2008; 2 (2) :35-41. [In Persian].
5. Martins A, Riboli DFM, Camargo CH, Pereira VC, de Almeida Sampaio R, de Souza da Cunha MLR. Antimicrobial resistance and persistence of Staphylococcus epidermidis clones in a Brazilian university hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77(2): 164-8.
6. Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani SH, Malekianzadeh E. Staphylococcus aureus resistance to vancomycin: a six years survey, (2006-2012). Med J Tabriz Univ Med Sci 2014; 35(2): 40-5. [In Persian].
7. Taylor AR. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Prim Care 2013; 40(3): 637-54.
8. Sahebnasagh R, Saderi H, Owlia P. the prevalence of resistance to methicillin in Staphylococcus aureus strains isolated from patients by PCR method for detection of mecA and nuc genes. Iran J Public Health 2014; 43(1): 84-92.
9. Loncaric I, Kubber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, et al. mecC- and mecA-positive meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from livestock sharing habitat with wildlife previously tested positive for mecC-positive MRSA. Vet Dermatol 2014; 25(2): 147-8.
10. Pereira LA, Harnett GB, Hodge MM, Cattell JA, Speers DJ. Real-time PCR assay for detection of blaZ genes in Staphylococcus aureus clinical isolates. J Clin Microbiol 2014; 52(4): 1259-61.
11. Xu Z, Mkrtchyan HV, Cutler RR. Antibiotic resistance and mecA characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Front Microbiol 2015; 6: 947.
12. Tahmasebi H, Bokaeian M, Adabi J. Coagulase-negative, beta-lactam, antibiotic resistance, methicillin resistance. J Jahrom Univ Med Sci 2016; 14(1): 55-63.
13. Fazzeli H, Arabestani MR, Esfahani BN, Khorvash F, Pourshafie MR, Moghim S, et al. Development of PCR-based method for detection of Enterobacteriaceae in septicemia. J Res Med Sci 2012; 17(7): 671-5.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015.
15. Ares M. Bacterial RNA isolation. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012(9): 1024-7.
16. Chan WS, Chan TM, Lai TW, Chan JF, Lai RW, Lai CK, et al. Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR-melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. J Antimicrob Chemother 2015; 70(2): 441-7.
17. Robles BF, Nóbrega DB, Guimarães FF, Wanderley GG, Langoni H. Beta-lactamase detection in Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus isolated from bovine mastitis. Pesqui Vet Bras 2014; 34: 325-8.
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.
19. Arede P, Ministro J, Oliveira DC. Redefining the role of the beta-lactamase locus in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: beta-lactamase regulators disrupt the MecI-mediated strong repression on mecA and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive mecA expression. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(7): 3037-45.
20. Arede P, Oliveira DC. Proteolysis of mecA repressor is essential for expression of methicillin resistance by Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(4): 2001-2.
21. Pence MA, Haste NM, Meharena HS, Olson J, Gallo RL, Nizet V, et al. Beta-Lactamase Repressor BlaI Modulates Staphylococcus aureus Cathelicidin Antimicrobial Peptide Resistance and Virulence. PLoS One 2015; 10(8): e0136605.
22. Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of mecA and mecA-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Australia and England. J Antimicrob Chemother 2002; 50(6): 819-24.
23. Uliczka F, Pisano F, Kochut A, Opitz W, Herbst K, Stolz T, et al. Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. PLoS One 2011; 6(6): e20425.
24. Bowers LM, Lapoint K, Anthony L, Pluciennik A, Filutowicz M. Bacterial expression system with tightly regulated gene expression and plasmid copy number. Gene 2004; 340(1): 11-8.

www.SID.ir

Arshive of SID

Journal of Isfahan Medical School Received: 25.06.2017

Vol. 35, No. 443, 3rd Week, October 2017 Accepted: 05.09.2017

The Study of blaZ and mecA Gene Expression in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains and the Relationship between the Gene Expression Patterns

Hamed Tahmasebi[1], Behruz Zeyni[2], Sanaz Dehbashi[3], Hamid Motamedi[4], Mahsa Vafaeefar[4], Fariba Keramat[5], Mohammad Reza Arabestani[6]

Original Article

Abstract

Background: Resistance to beta-lactams is the most important feature in Staphylococcus aureus (S. aureus). There is a possibility that the amount of resistance and beta-lactam antibiotic resistance gene expression are different in Staphylococcus resistant strains. The aim of this study was to determine the expression of mecA and blaZ genes in methicillin-resistant S. aureus and the relationship between gene expression patters.

Methods: In this experimental-analysis study, 120 clinical isolates of methicillin-resistant S. aureus were isolated from different clinical samples using phenotypic tests. To study the quality of the mecA and blaZ genes in resistant isolates, polymerase chain reaction (PCR) was used. In addition, the quantity of genes, SYBR-Green-1-based real-time PCR was applied. REST 2008 and SPSS software were used to analyze the data.

Findings: Out of 120 isolates of methicillin-resistant S. aureus, 105 isolates (87.5%) had blaZ gene. The most diverse gene expression changes in sample type were seen in blood and urine samples. So, the expression on the wound and urine clinical samples was dramatically more than the other sites. In addition, significant relationship was observed between the blaZ and mecA gene expression and the kind of clinical samples.

Conclusion: The results of this study suggested that different doses of antibiotics should be used to treat staphylococcal infections in different organs.

Keywords: Gene expression, Beta-lactams, Antibiotic resistance, Methicillin-resistant, Staphylococcus aureus

Citation: Tahmasebi H, Zeyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeefar M, Keramat F, et al. **The Study of blaZ and mecA Gene Expression in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains and the Relationship between the Gene Expression Patterns.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(443): 1062-7.

1- Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2- Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3- PhD Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
5- Professor, Brucellosis Research Centers, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
6- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani, Email: mohammad.arabestani@gmail.com

www.SID.ir