Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

بررسی فراوانی ژن *blaZ* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیمارستان‌های شهر همدان

رومینا کاکایی، امیرحسین مؤمن*، حسین وزینی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

***نویسنده مسئول:** امیرحسین مؤمن
گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران
تلفن: ۷۵۳۶-۸۲۰(۵۱۴)۱+
پست الکترونیک:
Momen@iauc.ac.ir

چکیده

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان عامل بیماری‌زای قدرتمند که عفونت‌های متعددی را ایجاد می‌کند شناخته شده است که امروزه مقاومت چند گانه‌ای نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله بتالاکتام‌ها کسب کرده است. بتالاکتامازها آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را هیدرولیز نموده و از طریق فعال شدن ژن *blaZ* بیان می‌شوند. لذا هدف این مطالعه بررسی فراوانی ژن *blaZ* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیمارستان‌های شهر همدان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی کلیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر همدان به‌صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه انتقال داده شد. در ایزوله‌های بالینی تأییدشده مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد و برای مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. داده‌ها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۴ تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌ها

از ۵۰ بیمار بستری در بیمارستان‌های فاطمیه و سینا در شهر همدان، به ترتیب از ۳۲ مورد مرد (۶۴ درصد) و ۱۸ مورد زن (۳۶ درصد) ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شد. در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، پنی‌سیلین (۱۰ µg) با ۱۰۰ درصد مقاومت و سفازولین (۳۰ µg) با ۵ درصد مقاومت به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را داشتند و در مجموع از ۵۰ نمونه بالینی، ۴۴ مورد (۸۸ درصد) ایزوله حاوی ژن بتالاکتاماز *blaZ* بود.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، ایزوله‌های جدا الگوی فراوانی یکسانی را نشان دادند. لذا این احتمال وجود دارد که در بیمارستان‌ها، انتقال مقاومت‌های دارویی یا شدت بیشتری صورت گیرد.

کلیدواژه‌ها

ژن blaZ، استافیلوکوکوس، ایزوله بالینی، مقاومت دارویی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

مقدمه

استافیلوکوکوس‌اورئوس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و همچنین پاتوژن‌های مهم اکتسابی از اجتماع می‌باشد. *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مسئول بیماری‌هایی ازجمله سندرم شوک سمی، سندرم فلسی‌شدن پوست، عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتریمی و سندرم شوک سپتیک می‌باشد. استافیلوکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت با ابعاد *(0/5-1/5nm)* می‌باشند که به‌صورت منفرد، جفت، چهارتایی، زنجیره‌های کوتاه و توده‌های نامنظم شبیه خوشه انگور دیده می‌شوند. اکثر گونه‌ها، فعالیت کاتالازی داشته و هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند. علاوه بر این غیر متحرک و غیر اسپورزا بوده و اغلب گونه‌ها در حضور ۱۰ درصد کلرور سدیم و دمای ۴۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد می‌باشند (۱). استافیلوکوکوس‌ها به‌راحتی در اغلب محیط‌های کشت، در شرایط هوازی یا بی‌هوازی رشد می‌کنند. منابع عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور عمده شامل انتشار باکتری از زخم‌ها، ترشحات آلوده زخم‌ها، دستگاه تنفسی و پوست می‌باشد. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از قبیل بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها می‌باشد که این امر موجب گسترش عفونت‌های ناشی از این باکتری و هم‌چنین بروز مشکلاتی از قبیل افزایش مرگ‌ومیر، افزایش میزان جراحات وارده به بیماران بستری‌شده، افزایش مدت‌زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها و افزایش هزینه‌های بیمه‌های درمانی گردیده و این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است. پردردسرترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، متعلق به بتالاکتامازها می‌باشد.(۲). بتالاکتاماز، آنزیمی است که بصورت غیرکوالانت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باند می‌کند و با تشکیل یک پیوند کووالانت، سبب هیدرولیز باند آمیدی حلقوی حلقه لاکتام و آزاد شدن آنتی‌بیوتیک تغییریافته (غیرفعال) می‌گردد. پروتئین‌های این آنزیم را ژن‌های متعددی کد می‌کنند. یکی از این ژن‌ها، ژن *blaZ* است (۳). بتالاکتامازها برای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، با *PBP* ها رقابت می‌کنند. امروزه بیشتر از ۱۰۰ نوع بتالاکتاماز شناخته شده که هر کدام الگو، اختصاصیت و تمایل مربوط به خود را دارند (۴). اصول شناسایی سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی را استوار می‌کند. برای از بین بردن خطاهای احتمالی در روش‌های فنوتیپی، می‌توان از روش ژنوتیپی وابسته به بررسی‌های مولکولار و ردیابی ژن موردنظر استفاده کرد. جهت انجام این کار با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا *PCR* می‌توان ژن *blaZ* را شناسایی نمود (۵). لذا هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن *blaZ* در ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان‌های شهر همدان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، نمونه‌گیری طبق مطالعه خالقی و همکاران در سال ۱۳۹۴، با استفاده از سواپ استریل از بینی و حلق بیماران بستری در بیمارستان‌های فاطمیه و سینا در شهر همدان به‌صورت تصادفی در طول ۶ ماهه دوم سال ۱۳۹۷ اخذ شدند (۵، ۶). معیار ورود به مطالعه حضور به مدت ۷۲ ساعت در بخش مراقبت‌های ویژه و معیار خروج از مطالعه وجود علائم عفونت در بدو ورود به بخش و وجود بیماری‌های زمینه‌ای (بنا به تشخیص پزشک متخصص) بود (۷). لازم به ذکر است که نمونه‌های بیماران سرپایی از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

جامعه مورد مطالعه حذف شدند. به منظور رعایت اصول اخلاقی و امانت و صداقت در پژوهش، ضمن هماهنگی‌های لازم، از بیماران مورد مطالعه برای نمونه‌گیری، رضایت نامه اخذ شد. سپس نمونه‌های جمع آوری شده داخل میکروتیوب پلاستیکی درب‌دار حاوی محیط ترانسپورت BHI با ۱۰ درصد گلیسرول تلقیح و برای آزمایش‌های دقیق‌تر به آزمایشگاه منتقل گردید. تا زمان انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جداسازی، شناسایی و کشت باکتری‌ها

نمونه‌های به دست آمده روی محیط بلاد آگار پایه و غنی شده با ۵ درصد خون تازه‌ی گوسفندی به صورت خطی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شد. پس از مشاهده کلنی‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت جدا سازی شدند. برای تفریق استافیلوکوک ها از استرپتوکوک از تست کاتالاز استفاده گردید. همچنین تست‌های کواگولاز و DNase و کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار نیز انجام شد (۸). برای تشخیص استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها تست OF (Oxidation and Fermentation) انجام گرفت.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی به هفت آنتی‌بیوتیک بتالاکتام شامل پنی‌سیلین ۱۰ میکروگرم، سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم، اگزاسیلین ۱ میکروگرم، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم، سفوتاکسیم، سفازولین ۳۰ میکروگرم و سفالکسین ۳۰ میکروگرم (ساخت کشور Mast انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion انجام شد. از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری‌های رشد یافته در محیط نوترینت آگار سوسپانسیونی با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع مولرهینتون تهیه و با سوآپ استریل روی سطح مولرهینتون آگار در سه جهت مختلف تلقیح شد و دیسک‌ها با فاصله ۲۲ میلی‌متر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک‌ها بعد از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند. قطر هاله عدم رشد با استفاده از آخرین نسخه مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی بررسی شد. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1431 (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) جهت کنترل آزمایشات تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شد.

استخراج DNA

ایزوله‌های بالینی تأییدشده با آزمایش‌های بیوشیمیایی ذخیره شده در ۲۰ درجه سانتی گراد روی محیط بلاد آگار پایه (شرکت مرک آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. چند کلنی از هر ایزوله کشت داده شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی براث (شرکت Merck آلمان) درون لوله‌های دردار شیشه‌ای شماره‌گذاری شده تلقیح و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های دردار ۱/۵ سی سی پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن Cat. (No.PR881614) بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

مراحل PCR

انجام PCR با DNA استخراج شده و PCR مستقیم برای شناسایی ژن blaZ از پرایمر زیر استفاده شد (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

جدول ۱-پرایمر مورد استفاده (شرکت سینا کلون ،ایران)

ژن های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (جفت باز)	رفرانس
blaZ	*blaZ (F,R)*	TACAACTGTAATATCGGAGGG AGGAGAATAAGCAACTATATCATC	۳۱۰	(۹)

سپس میکروتیوب‌های استریل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت (۲۰ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (شرکتAmpliqon ، آلمان) آماده شد (محتویات مسترمیکس شامل 5,(NH4)2SO4, 3mM.Tris-HCl pH=8 0.2 units/µl ،4mM dNTPs.0 ، 2 % Tween 20.MgCl2, 0 Ampliqon Taq DNA polymerase و Inert red dye and stabilizer بود). برای رساندن به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو برای کنترل منفی استفاده شد. سپس، آزمون PCR برای ژن blaZ با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) بر اساس پروتکل دمایی جدول (۲) انجام شد (۵).

جدول ۲- سیکل دمایی انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد نظر

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
شوک حرارتی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
جداشدن قطعات DNA	۹۴	۴۵	۳۰
جفت شدن پرایمرها	۵۵	۶۰	
طویل شدن پرایمرها	۷۲	۹۰	
طویل شدن نهایی	۷۲	۴۲۰	۱

الکتروفورز فرآورده‌های حاصل از (PCR): پس از تهیه ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE تهیه شده با غلظت ۰/۵ درصد، ۶ میکرولیتر از محصول نهایی PCR به همراه رنگ مخصوص ژل‌گذاری به نسبت ۱ به ۱ در چاهک‌های ژل ریخته و به مقدار ۲ میکرولیتر از مارکر ۱۰۰ bp فرمنتاز (شرکت Thermofisher، آمریکا) به عنوان خط‌کش DNA در چاهک اول ریخته شدند.

پنج میکرولیتر رنگ ™EURx-Simplysafe هنگام تهیه ژل به آن اضافه شد. نتیجه نهایی با دستگاه Gel Documentation (NANOLYTIC-Germany) بررسی و از آن عکس تهیه شد. **آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نسخه ۲۴ نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA و T-test انجام گرفت. مرز معنی‌داری روی $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

یافته‌ها

از ۵۰ بیمار بستری در بیمارستان مذکور، به ترتیب از جنس مرد ۳۲ مورد (۶۴ درصد)، جنس زن ۱۸ مورد (۳۶ درصد) ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد. میانگین سنی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

بیماران بستری مورد مطالعه ۱/۲ ± ۴۴/۸ سال محاسبه گردید. ارتباطی بین سن و فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وجود نداشت (P>۰/۰۵). براساس آزمون T-test انجام شده، میانگین رشد باکتری در مردان بیشتر از زنان است (P< ۰/۰۵). کلیه سویه‌های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت، DNase مثبت که بر روی مانیتول سالت آگار موجب تغییر رنگ محیط از قزمز به زرد، و سبب تغییر رنگ لوله محیط OF از سبز به زرد گردید، که نشان دهنده مثبت بودن نتیجه تست OF می‌باشد. بنابراین با توجه به مثبت بودن این آزمایش، نمونه‌ها به عنوان گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

شکل ۱- نتیجه تست OF استاف ورئوس و تغییر رنگ محیط‌کشت (سبز به زرد)

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دست آمده نیز به این صورت بود که پنی‌سیلین (۱۰ µg) با ۱۰۰ درصد مقاومت و سفازولین (۳۰ µg) با ۱۰ درصد مقاومت به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را داشت (شکل ۲).

شکل ۲- نتایج تست آنتی بیوگرام روی پلیت

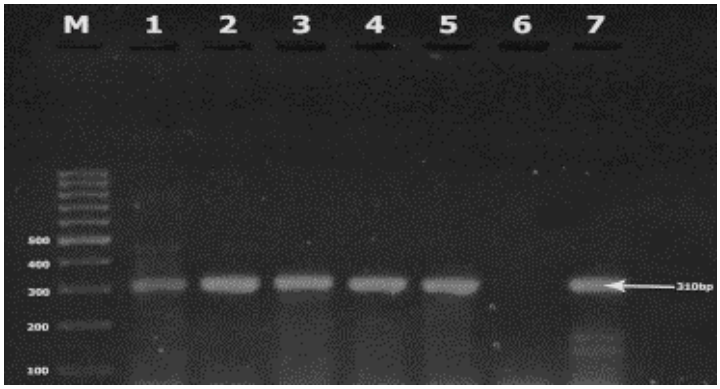
همچنین ۹۴ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سفوکسیتین (۳۰ µg) و ۹۰ درصد ایزوله‌ها به اوگزاسیلین (۱ µg) مقاوم بودند وهمچنین ۷۲ درصد ایزوله ها مقاوم به سفتریاکسون و۶۴ درصد ایزوله ها مقاوم به سفالکسین ودر آخر ۵۰درصد ایزوله ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند.. با توجه به آنالیز (ANOVA) میانگین تعداد افراد حساس، نیمه مقاوم و مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف متفاوت است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار است (p< ۰/۰۵).

از مجموع ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های بالینی، ۴۴ (۸۸ درصد) ایزوله حاوی ژن بتالاکتاماز بودند (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021



شکل ۳- نتیجهٔ الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ژن *blaZ*؛ چاهک M مارکر bp ۱۰۰، چاهک‌های ۱ تا ۵ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *blaZ*. چاهک ۶ کنترل منفی. چاهک ۷ کنترل مثبت.

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از ترشحات بینی افراد مشکوک به عفونت‌های دستگاه تنفسی بستری در بیمارستان‌های فاطمیه و سینا در شهر همدان با دو روش معمول آنتی‌بیوگرام و مولکولی PCR انجام شد. از مجموع ۵۰ نمونه مورد مطالعه، تمام این ایزوله‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند.

حساسیت سویه‌های جداشده به سفالکسین در مطالعه حاضر ۳۶ درصد گزارش شد، این در حالی است که در مطالعه‌ای صفدری و همکاران در بیمارستان قائم مشهد این میزان ۵۷ درصد (۱۰)، در مطالعه توکلی و همکاران ۸۱/۶ درصد (۱۱) و در مطالعه قاسمیان و همکاران در سال ۱۳۸۳، ۶۹/۴ درصد گزارش شد (۱۲). در مورد دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابه یا متفاوتی با دیگر محققان از ایران یافت شد که این اختلاف می‌تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه، روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمید قابل انتقال و غیره باشد. همچنین در این مطالعه مقاومت ۱۰۰ درصدی به پنی‌سیلین و شیوع ژن blaZ در بیش از ۸۰ درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد. این نتایج با نتایج هیستاتونه و همکاران که شیوع این ژن را ۹۸ درصد اعلام کرده بودند (۱۳) و مطالعات روساتو و همکاران (۱۴) که شیوع ۹۶ درصدی از ژن blaZ به دست آوردند مشابه است. الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها هم مؤید این موضوع است که ایزوله‌های به دست آمده به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاومت دارد. در مطالعات چونگ و همکاران بیشترین مقاومت ایزوله‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی بود، به طوری که ۹۲ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن blaZ و مقاومت نسبت به سفازولین ۳۵ درصد گزارش شده بود که بیش از مقدار گزارش شده در مطالعه حاضر است (۱۵). کمترین میزان مقاومت در این مطالعه مربوط به آنتی بیوتیک سفازولین (۵ درصد) بود که با مطالعهٔ آسانت و همکاران همخوانی دارد (۱۶). بیشترین مقاومت‌های گزارش شده در مطالعه ما مربوط به پنی‌سیلین با ۱۰۰ درصد و سفوکسیتین و اگزاسیلین با بیش از ۹۰ درصد مقاومت بود که مشابه با نتایج به دست آمده در مطالعه لی و همکاران است (۱۷). همچنین مقاومت به اوگزاسیلین و سفوکسیتین هم که بعد از پنی‌سیلین از مقاوم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه بودند که با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

مشاهدات فیسلر و همکاران در آلمان مشابهت دارد (۱۸). مقاومت به آنتی‌بیوتیک سفازولین از کمترین میزان خود در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بود که این نتایج با داده-های به‌دست آمده در مطالعه تاکاشی و همکاران در ژاپن و مطالعه نهایی و همکاران در ایران مشابهت دارد (۱۹). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۳، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، کلیندامایسین، توبرامایسین و تتراسیکلین گزارش شد (۲۰). در مطالعه حسن زاده و همکاران در تهران بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و اریترومایسین گزارش شد (۲۱). نتایج مطالعه حداد و همکاران در سال ۲۰۱۷ ، بیشترین مقاومت را به ترتیب نسبت به کانامایسین (۸۰٪)، توبرامایسین (۷۱٪)، آمیکاسین (۵۳٪) و جنتامایسین (۳۱٪) نشان داد (۲۲).

شش مورد از ایزوله‌های به دست آمده از نظر ژنوتیپی فاقد آنزیم بتالاکتاماز بود، اما از نظر فنوتیپی مقاومت به پنی-سیلین را از خود نشان داد. یک مورد از ایزوله‌های مورد آزمایش هم که از نظر ژنوتیپی مثبت گزارش شد، به صورت حد واسط به پنی‌سیلین مشاهده شد که به صورت مقاوم به پنی‌سیلین در نظر گرفته شد. شیوع بالای آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و سفالکسین نشان دهنده مصرف بیش ازحد کلاس‌های مختلف سفالوسپورین‌هاست. در بیشتر مطالعات، نتایج مورد بررسی در ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی با روش‌های ژنوتیپی انجام و گزارش شده است (۲۳). این در حالی است که برای غربالگری فنوتیپی سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین از دیسک پنی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن استفاده می‌شود که اگر دارای هاله کمتر از ۲۹ میلی‌متر باشد، مقاوم به پنی سیلین شناسایی می‌شود. همچنین، از روش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) نیز می‌توان به این نتیجه رسید، به طوری که اگر MIC جدایه‌های مورد بررسی بیش از ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باشد، مقاوم به پنی‌سیلین در نظر گرفته می‌شود (۲۴). با این حال، روش‌های فنوتیپی همیشه مشکلات مربوط به خود را دارد و در برخی موارد دارای مشکلاتی است که نتایج را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵)، از جمله نگه‌داری دیسک‌ها در شرایط مناسب و جلوگیری از عدم آلوده شدن آن‌ها هنگام استفاده و ذخیره سازی مجدد، آلوده شدن محیط‌های کشت هنگام کشت و دیسک‌گذاری، تأثیر منفی pH، تأثیر منفی افزایش یا کاهش بیش از حد دما در بیشتر مواقع، زمان بر بودن مشخص شدن نتایج که حداقل ۲۴ ساعت و در برخی مواقع ۴۸ ساعت زمان نیاز است تا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مدنظر مشخص گردد. از کاستی‌های این پژوهش علاوه بر خطای انسانی در مراحل دیسک‌گذاری آنتی‌بیوگرام و آلوده شدن محیط کشت، می‌توان به نبود امکانات کافی و محدودیت‌های دسترسی به بیماران با عفونت دستگاه فوقانی و نیز عدم همکاری و رضایت بیماران در اخذ نمونه اشاره کرد. بنابراین امکان اینکه تعداد نمونه‌های بیشتری گرفته شود، وجود نداشت و همچنین بهتر است در بیمارستان اشخاصی باشند که دانشجویان رشته میکروبیولوژی را هدایت کنند و پرسشنامه‌های استاندارد تهیه شود یا نرم افزارهای استاندارد برای روش‌های اماری استفاده شود یا تست‌های انجام شده با کاربردهای مناسب‌تری ارائه شود.

تفاوت‌های موجود بین نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگرمی تواند به دلیل تفاوت در فراوانی و شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در بین کشورهای مختلف، بیمارستان‌های متفاوت و بخش‌های بیمارستانی و حتی بین افراد یک جامعه

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

باشد که مرتبط با میزان مصرف آنتی بیوتیکی در این مناطق، بروز مکانیسم‌های مختلف مقاومت انتخاب و انتشار کلون‌های مقاوم تحت فشار مصرف آنتی بیوتیکی باشد (۲۶). شاید این دلیلی دیگر برای انجام این گونه مطالعات باشد تا بتوان الگوی مقاومتی هر منطقه و بیمارستان را شناسایی و در راستای آن شیوه‌های کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار مقاومت و مهمتر از همه کمک به انتخاب شیوه‌های مناسب درمانی برای رهایی بیماران از عفونت‌های ناشی از این پاتوژن مهم و بسیار مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در زمینه تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از بیماران نشان می‌دهد که به سختی می‌توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به کاربرد. بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگرچه بعضی از آنتی بیوتیک‌ها هنوز تاثیر نسبتاً خوبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند؛ ولی برخی دیگر عملا از دایره کاربرد خارج شده و یا به زودی خارج خواهند شد. هرچند عمده‌ترین علت مقاومت دارویی را به وجود ژن‌های قابل انتقال نسبت داده اند؛ اما نباید از نظر دور داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها به گزینش باکتری‌های با مقاومت چند دارویی می‌انجامد. در پژوهش ما طبق نتایج به دست آمده از مجموع ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های بالینی ۴۴ (۸۸ درصد) ایزوله حاوی ژن بتالاکتاماز *blaZ* بود. بیشترین میزان مقاومت در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰٪) و کمترین سفازولین (۱۰٪) بود. بدون شک با مطالعات بیشتر اهمیت هر یک از ژن های بتالاکتاماز در پاتوژنز *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت‌های بیمارستانی مشخص خواهد شد که این یافته‌ها جهت طراحی معیارهای پیشگیری کننده نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان و پرسنل محترم آزمایشگاه‌های خصوصی و بیمارستان‌های مورد مطالعه قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافعی برای نویسندگان وجود ندارد.

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

References

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(3): 603-61.
2. 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. [Persian]
3. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of blaZ gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(8): 4474-7.
4. 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.
5. Bokaeian M, Tahmasebi H, Adabi J, Mohammad Zadeh A, Mardaneh J. Molecular study of the blaZ Staphylococcus aureus gene isolated from clinical samples. JSUMS 2018; 25(1):31-37. [Persian]
6. Khaleghi M,Zarei H, Bokaeian M, Saeidi S. Evaluation of colonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in hospitals of Zabol city in 2010. Applied Biology, 2015; 28(1): 51-58. [Persian]
7. Kaspar DL, Braunwald E, Fauci AS, Lauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrisons Principles of Internal Medicine. 16thed. (2005), Volume 1, chapter116, P: 775-781.
8. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9(1): 23.
9. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β-Lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; 46(9): 2797-803.
10. Safdari H, Sadeghian A, Tahaghogi S. The Antibiotic Resistance Pattern of Staphylococcus aureus Isolated From Patients in Quaem University Hospital During 2009- 2011. Mashhad Med J. 2012; 1(1): 39- 41.
11. Tavakoli A, Yazdani R, Bakaeiyan M. Comparison of coagulase- positive staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics. Zahedan Univ Med J. 2002; 3(10): 1-5.[Persian]
12. Ghassemian R, Najafi N, Shojaeifar A. The prevalence of Staphylococcus aureus nasal carriers and pattern Antibiotic resistance in the Employee Training Center –Razi Ghaem Shahr City in fall 2004. Mazandaran Univ Med J. 2004; 14 (44): 79- 86.
13. Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, et al. Emergence of staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57(12): 6131-40.
14. Rosato AE, Kreiswirth BN, Craig WA, Eisner W, Climo MW, Archer GL. mecA-blaZ corepressors in clinical staphylococcus aureus isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(4): 1460-3.
15. Chong Y, Park S, Kim E, Bang K, Kim M, Kim SH, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible Staphylococcus aureus blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(2):349-55.
16. Assant S, Valour F, Mouton W, Martins-Simões P, Lustig S, Laurent F, et al. 2016. Methicillin-susceptible strains responsible for postoperative orthopedic infection are not selected by the use of cefazolin in prophylaxis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 84(3):266-7.
17. Li J, Echevarria KL, Hughes DW, Cadena JA, Bowling JE, Lewis JS. Comparison of cefazolin versus oxacillin for treatment of complicated bacteremia caused by methicillin-susceptible staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(9): 5117-24.
18. Fessler A, Billerbeck C, Kadlec K. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(8):1576-82.
19. Kitao T. Survey of methicillin-resistant coagulasenegative staphylococci isolated from the fingers of nursing students. J Infect Chemother. 2003; 9(1):30-4.
20. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive staphylococcus aureus isolates in Tehran, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6:144-149.
21. Hassanzadeh S, Pourmand MR, Hadadi A, Nourijeylani K, Yousefi M, Mashhadi R. Frequency and antimicrobial resistance patterns of methicillin resistant staphylococcus aureus in Tehran. J Med Bacteriol. 2013; 2:41-46.

www.SID.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

22. Haddad Sabzevar A, Abdollahzadeh H. Prevalence of aac (6')-Ie-aph (2%)-Ia gene among clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from selected hospitals in Mashha. JSUMS,2017;23(1),31-39. [Persian
23. Qian M, Tang S, Wu C, Wang Y, He T, Chen T, et al. Synergy between baicalein and penicillins against penicillinase-producing Staphylococcus aureus. IJMM. 2015; 305(6):501-4.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. CLSI M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2018.
25. Khalili H, Soltani R, Negahban S, Abdollahi A, Gholami K. Reliability of disk diffusion test results for the antimicrobial susceptibility testing of nosocomial gram-positive microorganisms: Is E-test Method Better? IJPR. 2012; 11(2): 559-63.
26. King M, Humphrey B, Wang Y, Kourbatova EV, Ray S, Blumberg HM. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. Ann Intern Med. 2006; 144:309-317.

www.SID.ir

Archiv

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:14 IRST on Tuesday January 12th 2021

Prevalence of *blaZ* in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Isolated from Hamedan Hospitals

Romina Kakaei, Amir Hossein Momen *, Hossein Vazini

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Original Article

Received: 2 Nov 2019
Accepted: 10 Mar 2020

***Corresponding Author:**
Dr.Amir Hossein Momen.
Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Hamedan Branch, Hamedan, Iran

TEL: +1(514)820-7536
Email: Momen@iauc.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) has been recognized as a powerful pathogen that causes numerous infections. Today, *S.aureus* has acquired multiple resistance to a wide range of antibiotics, including beta-lactams. Beta-lactamases hydrolyze beta-lactam antibiotics and are expressed through activation of the blaZ gene. The aim of this study was to evaluate the frequency of blaZ gene in clinical isolates *of S.aureus* isolated from Hamadan hospitals.

Materials and Methods

In this descriptive cross-sectional study, all *S.aureus* strains were randomly selected and transferred to the laboratory. In clinical isolates confirmed by biochemical tests of genomic DNA extraction procedures using CinnaGen extraction kit) was performed according to the manufacturer's protocol and 1% agarose gel was used to view the PCR product. Data were analyzed by SPSS software.

Results

From 50 hospitalized patients in Fatemieh and Sina hospitals, ۳۲ men (64%), and 18 women (36%), isolates *of S.aureus* were isolated. The pattern of antibiotic resistance obtained was that penicillin (10 µg) with 100% resistance and cefazolin (30 µg) with 5% resistance had the highest and lowest resistance, respectively. Also, 94% of isolates were resistant to cefoxitin (30 µg) and 90% of isolates were resistant to oxacillin (1 µg). Of 50 *S.aureus* isolated from clinical isolates, 44 (88 %) contained the blaZ beta-lactamase gene.

Conclusion

Based on the findings of this study, isolates isolated from clinical specimens showed the same pattern of abundance .Therefore, it is likely that more or more drug resistance will be transmitted to hospitals.

Keywords

Gene blaZ, Staphylococcus, Clinical Isolate, Drug resistance

► ***Please cite this article as:*** Kakaei R, Momen H, Vazini H. Prevalence of blaZ in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus Isolated from Hamedan Hospitals. J Neyshabur Univ Med Sci 2020;8(3):48-58.

www.SID.ir