

Original Paper

Frequency of *mecA* and *blaZ* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples by PCR method

Yasaman Rahnama (M.Sc), M.Sc in Microbiology, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

ORCID ID: 0000-0001-9789-2153

*Ailar Jamalli (Ph.D), Corresponding Author, Associate Professor, Laboratory Sciences Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. E-mail: jamali@goums.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-4612-8144

Teena Dadgar (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-0839-0838

Abstract

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the most common cause of nosocomial infections. Treatment of *Staphylococcal* infections has become more complicated due to the emergence of methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) strains. This study was done to determine the frequency of methicillin resistance encoding gene (*mecA*) and β -lactamase resistance encoding gene (*blaZ*) in *S. aureus* isolates from clinical samples using Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

Methods: This descriptive-analytic study was carried out on 59 *S. aureus* isolates from clinical samples in Gorgan hospitals from January-February 2017 to June-July 2017. All the isolates were identified using gram staining, catalase test, tube coagulase test, growth on Mannitol salt agar medium and the DNase test in the Microbiology Laboratory. Antibiotic resistance was evaluated using the standard disk diffusion. Iodometric method was used to detect β -lactamase production / activity in this bacterium. PCR test was done to detect *mecA* and *blaZ* genes.

Results: All *S. aureus* isolates (100%) clinical samples possessed *blaZ* gene, followed by 27 isolates (45.8%) possessed *mecA* gene (MRSA), which these isolates possessed *mecA* gene were concurrently positive for *blaZ* gene. 5% of oxacillin-resistant strains and 3% of cefoxitin-resistant strains possessed *mecA* gene and 47 isolates (79.4%) carrying *blaZ* gene were β -lactamase-positive in phenotypic method.

Conclusion: This study showed that in all clinical samples isolated *S. aureus* isolates which these isolates possessed *mecA* gene were concurrently positive for *blaZ* gene.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *blaZ* gene, *mecA* gene, PCR

Received 24 Nov 2018

Revised 18 May 2019

Accepted 20 May 2019

Cite this article as: Yasaman Rahnama, Ailar Jamalli, Teena Dadgar. [Frequency of *mecA* and *blaZ* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples by PCR method]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Winter; 21(4): 79-85. [Article in Persian]

فراوانی ژن های *blaZ* و *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی با روش PCR

ORCID ID: 0000-0001-9789-2153

یاسمن رهنما، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-4612-8144

* دکتر آیلر جمالی، دانشیار، مرکز تحقیقاتی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-0839-0838

دکتر تینا دادگر، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل مهم عفونت های بیمارستانی است. درمان عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس با حضور گونه مقاوم به آنتی بیوتیک متی سیلین (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus: MRSA*) پیچیده تر شده است. *mecA* ژن کدکننده مقاومت به متی سیلین و *blaZ* ژن کدکننده مقاومت به آنزیم بتالاکتاماز است. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن های *mecA* و *blaZ* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ۵۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های بالینی بیمارستان های شهر گرگان طی مدت شش ماه (از بهمن ۱۳۹۵ لغایت تیر ۱۳۹۶) جمع آوری شدند. ایزوله ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست های کوآگولاز، کاتالاز، *Dnase* و تخمیر قند مانیتول تعیین هویت شدند و با روش دیسک دیفیوژن مقاومت آنتی بیوتیکی ارزیابی گردید. از روش یدومتری برای تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در این باکتری استفاده شد. سپس تشخیص ژن های *mecA* و *blaZ* با استفاده از روش PCR انجام گردید.

یافته ها: همه ۵۹ ایزوله (۱۰۰ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس برای ژن *blaZ* مثبت و به دنبال آن، ۲۷ ایزوله (۴۵/۸ درصد) دارای ژن *mecA* بودند که به طور همزمان ایزوله های دارای ژن *mecA* از لحاظ حضور ژن *blaZ* مثبت بودند. میزان ۵ درصد از ایزوله های مقاوم به اگزاسیلین و ۳ درصد از ایزوله های مقاوم به سفوکسی تین دارای ژن *mecA* بودند. ۷۹/۴ درصد از ایزوله های دارای ژن *blaZ* در تست فنوتیپی بتالاکتاماز مثبت بودند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که تمام ایزوله های جدا شده دارای استافیلوکوکوس اورئوس با ژن *blaZ* بودند و به طور همزمان ایزوله های دارای ژن *mecA* از لحاظ حضور ژن *blaZ* مثبت بودند.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن *blaZ*، ژن *mecA*، PCR

* نویسنده مسؤول: دکتر آیلر جمالی، پست الکترونیکی jamali@goums.ac.ir

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقاتی علوم آزمایشگاهی، تلفن ۰۱۷-۳۲۴۵۱۶۵۱

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۹/۳، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۲/۲۸، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۲/۳۰

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت است که به عنوان فلور طبیعی بدن انسان روی پوست، در بینی افراد سالم و گلو ممکن است یافت شود (۱، ۲).

استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل مهم عفونت های بیمارستانی شامل باکتری می، عفونت های زخم جراحی، پنومونی، اندو کاردیت، استئومیلیت و همچنین عفونت های بافت نرم از قبیل زرد زخم، سندرم پوستی فلسی شونده / استافیلوکوکوسی (*staphylococcal scalded skin syndrome*)، سندرم شوک توکسیک و مسمومیت غذایی است (۳-۵). استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مهم برای انواع بیماری ها با منشا عفونت های پوستی و بافت نرم، مسمومیت غذایی تا بیماری های بسیار جدی

مانند استئومیلیت و اندو کاردیت است (۶). استافیلوکوکوس اورئوس توانایی زیادی برای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها دارد (۷). منابع اصلی استافیلوکوکوس اورئوس در عفونت های بیمارستانی ضایعات اسپتیک و سایت های حمل و نقل بیماران و کارکنان هستند (۸). درمان عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس با حضور گونه مقاوم به آنتی بیوتیک متی سیلین (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus: MRSA*) پیچیده تر شده است (۹). اولین استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در سال ۱۹۶۱ در انگلستان شناسایی شد (۳). تا ظهور پاتوژن های مقاوم به پنی سیلین در سال ۱۹۵۰، با کشف پنی سیلین در دهه ۱۹۴۰ به طور چشمگیری در درمان بیماران مبتلا به عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود. متی سیلین برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ به منظور درمان عفونت های ایجاد شده

فراوانی ژن های *blaZ* و *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی با استفاده از روش PCR انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان طی سال های ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد.

جمع آوری نمونه و شناسایی اولیه: تعداد ۵۹ نمونه بالینی مختلف استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به عفونت های آبسه، خون، خلط، چشم، زخم و ادرار از بیماران و بینی افراد سالم مراجعه کننده به بیمارستان های شهر گرگان از بهمن ماه سال ۱۳۹۵ لغایت تیرماه سال ۱۳۹۶ جمع آوری گردید. به همراه نمونه بالینی برای هر فرد یک پرسشنامه حاوی اطلاعات دموگرافیک مربوط به سن، جنس و محل عفونت افراد تکمیل و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان ارسال شد. ایزوله ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست های کوآگولاز، کاتالاز، Dnase و تخمیر قند مانیتول تعیین هویت شدند (۱۶). نمونه ها با رضایت افراد شرکت کننده در مطالعه وارد گردید.

سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی بیوتیکی: با روش دیسک دیفیوژن از دیسک های آنتی بیوتیکی اگزاسیلین (یک میکرو گرمی) و سفوکسی تین (۳۰ میکرو گرمی)، شرکت روسکو کشور آمریکا برای تعیین مقاومت ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به متی سیلین استفاده شد. بدین ترتیب که از کشت ۲۴ ساعته باکتری های آزمایشی سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد و سپس دیسک ها با فاصله استاندارد قرار داده شدند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند.

بر اساس دستور کار مؤسسه استانداردهای آزمایشگاه بالینی (Clinical Laboratory Standards Institute: CLSI) قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها بررسی شد (۱۷ و ۱۶). میزان مقاومت بر اساس قطر هاله عدم رشد برای اگزاسیلین کمتر مساوی ۱۰ میلی متر (۱۸) و برای سفوکسی تین کمتر یا مساوی ۱۴ میلی متر (۱۹) در نظر گرفته شدند.

سنجش ژنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی: در ابتدا سویه های استافیلوکوکوس اورئوس برای استخراج DNA به محیط BHI Broth شرکت Merck کشور آلمان انتقال داده شدند. به روش فنل کلروفورم ایزو آمیل الکل DNA استخراج و مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). DNA استخراج شده برای انجام PCR تا زمان اجرای آزمایش در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Mastercycler personal / eppendorf کشور آلمان انجام شد. مخلوطی از ۱۲/۵ میکرو لیتر ترکیب

به واسطه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین معرفی شد. مقاومت به متی سیلین در MRSA به دلیل کسب ژن *mecA* است. این ژن یک پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (Penicillin-Binding-Proteins: PBP2a) را با میل ترکیبی پایین به آنتی بیوتیک های بتالاکتام کد می کند. MRSA در سراسر جهان شایع است و به عنوان مهم ترین عامل عفونت های کسب شده از بیمارستان و کسب شده از جامعه ناشی از افزایش بیماری و مرگ و میر در محیط های بیمارستان بررسی می شوند (۱۰). ساز و کار مقاومت به بتالاکتام ها از بین بردن حلقه بتالاکتام در آنزیمی اختصاصی به نام بتالاکتاماز است. پروتئین های این آنزیم را ژن های متعددی کد می کند. یکی از این ژن ها، ژن *blaZ* است. ژن *blaZ* مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام از قبیل پنی سیلین است و در استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت وجود دارد (۱۱). ژن *blaZ* یک آنزیم خارج سلولی به نام بتالاکتاماز را کد می کند که در میان باکتری های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس شایع است. آنزیم بتالاکتاماز حلقه بتالاکتام در آنتی بیوتیک های بتالاکتام از قبیل پنی سیلین را تجزیه می کند. به نحوی که ساختار تغییر یافته دارو نمی تواند اتصال مؤثری با PBP هابرقرار نماید و سنتز دیواره سلولی ادامه می یابد (۱۲). در مطالعه Surekha و Jeshina در سال ۲۰۰۹ در هند، ۷۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) بررسی شدند. گونه های مقاوم به متی سیلین که از لحاظ ژن *mecA* منفی بودند؛ حاوی ژن *blaZ* بودند که آنزیم بتالاکتاماز تولید می کنند. همه ۷۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بودند و ۱۰۰ درصد مقاومت به آمپی سیلین و اگزاسیلین نشان دادند و ژن *mecA* از ۸۸ درصد گونه ها جدا شد (۱۳). در تحقیقی از جمعه پور و رضایی منش در سال ۱۳۹۵ در تربت حیدریه حضور استافیلوکوکوس اورئوس در بینی ۲۸ نفر (۲۱/۵ درصد) کارکنان بیمارستان گزارش شد. بیشترین مقاومت به پنی سیلین (۱۰۰ درصد) و ۱۴ نمونه (۱۰/۸ درصد) مقاومت به متی سیلین گزارش شد (۱۴). در مطالعه بکائیان و همکاران در سال ۱۳۹۶ در زاهدان ۸۹ ایزوله (۵۲/۳۵ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ژن *mecA* مثبت گزارش شد (۱۵). لذا برای از بین بردن خطای احتمالی در روش فنوتیپی می توان از روش مولکولار و ردیابی ژن های مورد نظر استفاده کرد و از آنجا که در بازه زمانی این پژوهش مطالعه ای مشابه مطالعه حاضر در منطقه صورت نگرفته و بیشتر گزارشات آنتی بیوتایینگ با تست های فنوتیپی ارایه شده است و مقاومت آنتی بیوتیکی ارگانیسما به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس به طور چشمگیر در حال افزایش است؛ لذا این مطالعه به منظور تعیین

لومیناتور زیر نور UV مشاهده شدند.
آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-22 و آزمون کای اسکوئر در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

محدوده سنی آزمودنی‌ها از یک سال تا ۶۰ سال متغیر بود. اکثر بیماران و ناقلین در محدوده سنی ۴۵-۲۵ سال قرار داشتند. تعداد ۲۵ نفر (۱۴ نفر مونث و ۱۱ نفر مذکر) سالم ناقل استافیلوکوکوس اورئوس و تعداد ۳۴ نفر (۱۵ نفر مونث و ۱۹ نفر مذکر) بیمار بستری در بیمارستان مبتلا به استافیلوکوکوس اورئوس بودند. بیشترین میزان مراجعین (۴۷ درصد) بیماران بستری در بخش‌های داخلی بودند.
 بررسی الگوی مقاومت به متی‌سیلین در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران و ناقلین نشان داد که با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین (یک میکرو گرمی)، تعداد ۵ ایزوله و بر مبنای سفوکسی‌تین، تعداد ۳ ایزوله در روش دیسک دیفیوژن، مقاوم به متی‌سیلین هستند.
 نتایج بررسی فنوتیپی تولید بتالاکتامازبیانگر آن است که ۴۷ مورد از ۵۹ ایزوله (۷۹/۴ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس

مستر میکس شرکت AMPLIQON کشور دانمارک، یک میکرولیتر از هر جفت پرایمر F و R (۱۰ پیکومول)، ۴ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده را با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رساندیم.

مراحل PCR برای شناسایی ژن گلو تامات سنتتاز ۴۴۲sa (گونه اورئوس) در استافیلوکوک‌ها در جدول یک آمده است. مراحل PCR برای شناسایی ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و نیز برای شناسایی ژن *blaZ* در استافیلوکوکوس اورئوس در جدول یک آمده است.

در آزمون‌های PCR فوق از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۹۲۱۳ برای شناسایی ژن *blaZ* و سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس COL (مقاوم به متی‌سیلین) برای شناسایی ژن *mecA* به عنوان کنترل مثبت و همچنین از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

پرایمرها با توالی‌های ذکر شده در جدول ۲ مورد استفاده قرار گرفتند. محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز ۱/۵ درصد، شرکت CONDA کشور اسپانیا، حاوی سایبرگرین، شرکت SinaClon کشور ایران، ران شدند و با استفاده از دستگاه ترانس

جدول ۱: مراحل PCR برای شناسایی ژن گلو تامات سنتتاز ۴۴۲sa (گونه اورئوس) در استافیلوکوک‌ها، شناسایی ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و شناسایی ژن *blaZ* در استافیلوکوکوس اورئوس

شناسایی ژن	مرحله	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
ژن گلو تامات سنتتاز ۴۴۲sa (گونه اورئوس)	واسرشته شدن اولیه	۳ دقیقه	۹۶
	واسرشته شدن (۴۰ سیکل)	۱ ثانیه	۹۵
	اتصال (۴۰ سیکل)	۳۰ ثانیه	۶۰
	تکثیر (۴۰ سیکل)	۳۰ ثانیه	۷۲
	تکثیر نهایی	۵ دقیقه	۷۲
ژن <i>mecA</i> در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین	واسرشته شدن اولیه	۴ دقیقه	۹۴
	واسرشته شدن (۳۵ سیکل)	۱ دقیقه	۹۴
	اتصال (۳۵ سیکل)	۱ دقیقه	۵۶
	تکثیر (۳۵ سیکل)	۳ دقیقه	۷۲
	تکثیر نهایی	۵ دقیقه	۷۲
ژن <i>blaZ</i> در استافیلوکوکوس اورئوس	واسرشته شدن اولیه	۵ دقیقه	۹۴
	واسرشته شدن (۳۵ سیکل)	۳۰ ثانیه	۹۴
	اتصال (۳۵ سیکل)	۳۰ ثانیه	۵۵
	تکثیر (۳۵ سیکل)	۳۰ ثانیه	۷۲
	تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

جدول ۲: توالی و سایز پرایمرهای مورد استفاده

ژن	توالی نوکلئوتیدی (۳ - ۵)	اندازه محصول (bp)	رفرنس
<i>glutamate synthetase sa442</i>	F AATCTTTGTCGGTACACGATATCTTCACG	۱۰۸	۲۱
	R CGTAATGAGATTCAGTAGATAATAACA		
<i>mecA</i>	F AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	۵۳۳	۲۲
	R AGTTCTGCAGTACCGGATTGC		
<i>blaZ</i>	F AAGAGATTTGCC TATGCTTC	۵۱۸	۲۳
	R GCTTGACCACTT TTATCAGC		

جدول ۳: توزیع فراوانی ژن *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب منبع جداسازی

منبع جداسازی	تعداد (درصد)	
	مثبت (n=۲۷)	منفی (n=۳۲)
بیمار	۲۲ (۱۵/۶)	۱۲ (۱۸/۴)
ناقل	۵ (۱۱/۴)	۲۰ (۱۳/۶)
p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

جدول ۴: توزیع ژن *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس نوع نمونه بالینی

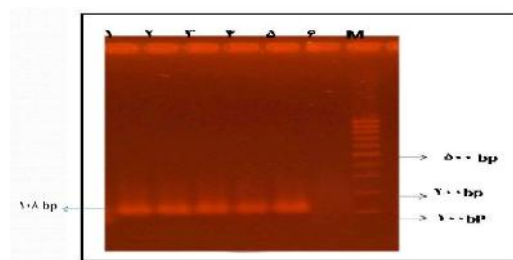
نمونه بالینی	تعداد (درصد)		p-value
	ژن <i>mecA</i> مثبت	ژن <i>mecA</i> منفی	
حلق	۶ (۴/۷)	۲ (۳/۳)	۰/۰۰۱
چشم	۲ (۲/۳)	۳ (۲/۷)	۰/۰۰۱
خون	۵ (۳/۲)	۲ (۳/۸)	۰/۰۰۱
زخم	۱ (۰/۹)	۱ (۱/۱)	۰/۰۰۱
آبسه	۲ (۰/۹)	۰ (۰)	۰/۰۰۱
ادرار	۶ (۶/۶)	۴ (۳/۴)	۰/۰۰۱
بینی	۵ (۱۱/۴)	۲۰ (۱۳/۶)	۰/۰۰۱

توزیع ژن *mecA* در نمونه های بالینی به ترتیب حلق ۶ مورد (۴/۷ درصد)، چشم ۲ مورد (۲/۳ درصد)، زخم یک مورد (۰/۹ درصد)، ادرار ۶ مورد (۶/۶ درصد)، خون ۵ مورد (۳/۲ درصد)، آبسه ۲ مورد (۰/۹ درصد) و بینی ۵ مورد (۱۱/۴ درصد) تعیین شد (جدول ۴). لذا بین حضور ژن *mecA* و منبع عفونت در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط آماری معنی دار آماری وجود داشت ($P < 0/001$). نتایج فراوانی ژن *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران و ناقلین نسبت به آنتی بیوتیک های بررسی شده نشان داد که ۵ مورد (۵ درصد) از ایزوله های مقاوم به آگراسیلین و ۳ مورد (۳ درصد) از ایزوله های مقاوم به سفوکسی تین دارای ژن *mecA* بودند. لذا ارتباط آماری معنی داری بین همزمانی ژن *mecA* در ایزوله های MRSA در روش دیسک دیفیوژن وجود داشت ($P < 0/05$). همه ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در ۵۹ نمونه بالینی (۱۰۰ درصد)، دارای ژن *blaZ* بودند و همچنین ۴۷ ایزوله (۷۹/۴ درصد) حامل ژن *blaZ* در روش یدومتری بتالاکتاماز مثبت بودند. لذا بین حضور ژن *blaZ* و تولید بتالاکتاماز در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط آماری معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$).

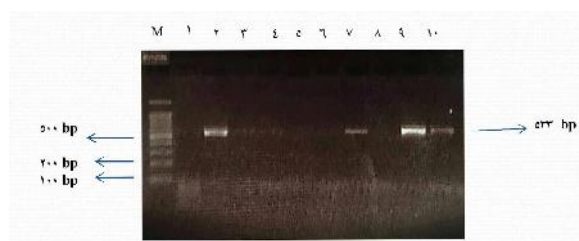
بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، ۱۰۰ درصد ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس در ۵۹ نمونه بالینی دارای ژن *blaZ* بودند و از بین ۵۹ نمونه بالینی، ۴۵/۸ درصد دارای ژن *mecA* بودند و در این بین ۱۱/۴ درصد در ناقلین و ۱۵/۶ درصد در بیماران مشاهده شد که به طور همزمان ایزوله های دارای ژن *mecA* از لحاظ حضور ژن

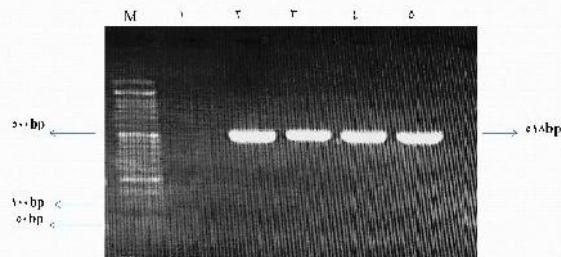
مورد بررسی بتالاکتاماز مثبت و ۱۲ مورد (۲۰/۳ درصد) از ایزوله ها بتالاکتاماز منفی در روش یدومتری هستند. محصولات PCR در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن گلو تامات سنتتاز ۴۴۲ sa (طول باند ۱۰۸bp) در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس
M: مارکر؛ ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵: نمونه های مثبت؛ ۶: کنترل منفی



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن *mecA* (طول باند ۵۲۳bp) در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس
M: مارکر؛ ۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹: نمونه های مثبت؛ ۱۰: نمونه های مثبت



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن *blaZ* (طول باند ۵۱۸ bp) در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس
M: مارکر؛ ۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳، ۴ و ۵: نمونه های مثبت

نتایج حاصل از تست PCR نشان داد که تمامی ۵۹ ایزوله دارای ژن گلو تامات سنتتاز بودند و استافیلوکوکوس اورئوس بودن آنها بدین روش نیز تایید شد. از بین ۵۹ نمونه بالینی، ۲۷ ایزوله (۴۵/۸ درصد) دارای ژن *mecA* و ۳۲ مورد (۵۴/۲ درصد) فاقد ژن *mecA* بودند که در بین این ۲۷ مورد *mecA* مثبت، ۵ مورد از ناقلین (۱۱/۴ درصد) و ۲۲ مورد در بین بیماران (۱۵/۶ درصد) مشاهده شد (جدول ۳) که به طور همزمان ایزوله های دارای ژن *mecA* از لحاظ حضور ژن *blaZ* مثبت بودند و ارتباط آماری معنی داری بین همزمانی ژن *mecA* با ژن *blaZ* در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس یافت شد ($P < 0/001$).

حساسیت را به ایمنی پشم داشتند. ۱۰۰ درصد سویه‌ها به پنی سیلین بالاترین مقاومت را نشان دادند و ۲۹ درصد ایزوله‌ها به متی سیلین مقاوم بودند. ۱۳ مورد از ۱۴ سویه مقاوم به متی سیلین ژن *mecA* مثبت گزارش شد. ویژگی‌های ژنتیکی *blaZ* در همه ایزوله‌های مقاوم به پنی سیلین یافت شدند (۳۰). مطالعات مشابهی در کشورمان نیز انجام شده که نشان می‌دهد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم وابستگی زیادی به ناحیه جغرافیایی و الگوهای زیستی و مصرف آنتی‌بیوتیک‌های رایج در منطقه دارد که خود دلیل تفاوت در نتایج مورد مطالعه است. به طوری که نتایج مطالعه صادری و همکاران نشان داد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در جدایه‌های MRSA و MSSA بالا است. لذا بررسی تغییر الگو مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دوره‌های مشخص می‌تواند در درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بسیار کارآمد باشد (۳۱).

به منظور جلوگیری از مقاومت دارویی پیشنهاد می‌گردد که قبل از استفاده از آنها از تست آنتی‌بیوگرام استفاده شود. به نظر می‌رسد انجام تست PCR در سویه‌های مقاوم به پنی سیلین و سفوکسی‌تین در تشخیص تولیدکننده‌های بتالاکتاماز در ارگانسیم‌ها ضروری بوده و با انجام این آزمایش می‌توان گزارش صحیح‌تری ارائه داد. همچنین پیشنهاد می‌شود استفاده بدون نسخه آنتی‌بیوتیک‌ها در موارد غیرضروری به منظور کاهش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها محدود شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تمام ایزوله‌های جدا شده دارای *استافیلوکوکوس اورئوس* با ژن *blaZ* بودند و به‌طور همزمان ایزوله‌های دارای ژن *mecA* از لحاظ حضور ژن *blaZ* مثبت بودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه (شماره ایران داک ۶۰۷۳۱۳۵) خانم یاسمن رهنما برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان بود. بدین وسیله از کارشناسان محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان و نیز از کارشناسان محترم آزمایشگاه مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به دلیل همکاری در اجرای این مطالعه صمیمانه تشکر می‌نمایم.

References

- Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheony H, Park Y. Colonization and Infection of the Skin by *S. aureus*: Immune System Evasion and the Response to Cationic Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci*. 2014 May; 15(5): 8753-72. doi: 10.3390/ijms15058753
- Mah FS, Davidson R, Holland EJ, Hovanessian J, John T, Kanellopoulos J, et al. Current knowledge about and recommendations for ocular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Cataract Refract Surg*. 2014 Nov; 40(11): 1894-908. doi: 10.1016/j.jcrs.2014.09.023

blaZ مثبت بودند. نتایج فراوانی ژن *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران و ناقلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده نشان داد که ۵ درصد از ایزوله‌های مقاوم به آگراسیلین و ۳ درصد از ایزوله‌های مقاوم به سفوکسی‌تین حامل ژن *mecA* بودند و نیز ۷۹/۴ درصد ایزوله‌ها حامل ژن *blaZ* بتالاکتاماز مثبت بودند. این در حالی است که در مطالعه نوروزی و همکاران در تهران میزان حضور ژن *blaZ* در نمونه‌های بالینی ۶۱/۹ درصد گزارش شد (۲۴). در مطالعه پورنجف و همکاران در تهران، ۴۵/۱ درصد ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *mecA* مثبت بود که مشابه یافته مطالعه حاضر است و میزان شیوع MRSA با روش دیسک دیفیوژن آگراسیلین ۴۷/۶ درصد گزارش شد (۲۵). همچنین خویی و همکاران در تبریز ۹۷ ایزوله (۵۳/۳ درصد) ژن *mecA* مثبت گزارش نمودند (۲۶). در مطالعه Amr و Al Gammal در کشور مصر، ۹۰ سویه (۷۸/۹ درصد) از ۱۱۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، MRSA گزارش شد و ۱۰ سویه (۸/۸ درصد) از ۱۱۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۱ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين گزارش شدند. ۸۸ سویه از ۹۰ سویه MRSA، ژن *mecA* را حمل نموده و همه ۱۰ ایزوله مقاوم به ونکومايسين برای ژن‌های *mecA* و *vanA* مثبت بودند (۹). در مطالعه Gomes و همکاران در کشور برزیل تعداد ۵۶ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از کشت‌های خون جدا شد. ۸۶ درصد نمونه‌ها از لحاظ حضور ژن *blaZ* مثبت و در ۸۴ درصد گونه‌ها ژن *mecA* گزارش شد (۲۷). همچنین در مطالعه Lee و Kim در کشور کره، از کل ۱۱۲ بیمار مبتلا به بیماری‌های دندانی، نمونه بزاق دهان جمع‌آوری شده شامل ۸۰ بیمار سرپایی در بیمارستان‌های دندان‌سازی و ۳۲ بیمار در کلینیک‌های دندان‌سازی ۳۷ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *blaZ* مثبت، ۲۷ سویه در بیمارستان و ۱۰ گونه در کلینیک‌های دندانپزشکی گزارش شد (۲۸). در مطالعه Jayaraj و Naseer در کشور هند، از بین ۳۶۰ سویه، فقط ۷ سویه مقاوم به ونکومايسين (۱/۹ درصد) و از لحاظ وجود ژن *mecA* مثبت گزارش شد (۲۹). در مطالعه Khattak و همکاران برای تعیین ویژگی‌های ژنتیکی مربوط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نواحی پوستی بیمارستان‌های Khyber pakhtunkhwa، پاکستان ۹۱/۶ درصد ایزوله‌ها بالاترین

- Alaouadi RF. Comparative phenotypic and genotypic study of MSSA and MRSA wound infections in Babylon. *AL-Qadisiya Journal of Vet Med Sci*. 2015; 14(2): 23-33. doi: https://doi.org/10.29079/vol14iss2art346
- Nwokah EG, Abbey SD, Wachukwu CK. *mecA* Gene Profile of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Clinical Sources in Port Harcourt, Nigeria. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2016; 4(3): 41-48. doi: 10.11648/j.ajbls.20160403.14

5. Rostamzad A, Rostamneia N, Pourahmad F, Shamsi M. Determination of vancomycin and methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in hospitals of Ilam city. Journal of Basic Research in Medical Sciences. 2016; 3(3): 1-6. doi: 10.18869/acadpub.jbrms.3.3.1
6. Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR. An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of *Staphylococcus aureus*. Infect Dis (Auckl). 2017 May; doi: 10.1177/1179916117703999. eCollection 2017.
7. Chambers HF, Deleo FR. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. Nat Rev Microbiol. 2009 Sep; 7(9): 629-41. doi: 10.1038/nrmicro2200
8. Solberg CO. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. Scand J Infect Dis. 2000; 32(6): 587-95.
9. Amr GE, Al Gammal S. Emergence of Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients in ICUs of Zagazig University Hospitals. The Egyptian Journal of Medical Microbiology. 2017 Apr; 26(2): 53-59. doi: 10.12816/0046229
10. Chaudhary M, Payasi A. Surveillance Study for MRSA Prevalence and Susceptibility Trends Against mecA and vanA Positive Clinical Isolates. International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry. 2015; 4(2): 469-77.
11. Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2006 Mar; 57(3): 450-60. doi: 10.1093/jac/dki492
12. Raei F, Eftekhari F. [Studying the presence of blaZ gene and -lactamase production in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*]. Iran J Med Microbiol. 2008; 2(2): 35-41. [Article in Persian]
13. Jeshina J, Surekha K. Molecular Characterization of Methicillin Resistant *S.aureus* Strains Isolated in Kerala, South India. Current Research in Bacteriology. 2009; 2(1): 1-6. doi: 10.3923/crb.2009.1.6
14. Jomehpour N, Rezaei Manesh MR. [Investigation of the frequency of *Staphylococcus aureus* carriers and its methicillin-resistant pattern in Torbat Heydariyeh hospitals staff in 2013]. Journal of Tanin Salamet (Health Chimes). 2016; 4(1): 42-49. [Article in Persian]
15. Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahraki Zahedani Sh, Adabi J. [An investigation of toxic shock syndrome Toxin-1 Gene in methicillin-resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR method]. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11(1): 57-67. [Article in Persian]
16. Izanloo A, Bahreini M, Sharifmoghdam MR, Safamanesh S, Azimian A. [Evaluation of vancomycin resistance by Phenotypic and genotypic methods among *S. aureus* strains isolated from patients]. J North Khorasan Univ Med Sci. 2016; 8(2): 215-24. [Article in Persian]
17. Sobhani Poor MH, Mansouri S, Saeidadel N. [Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Antibiotic Resistance Patterns of the Isolates from the Nose of Training Soldiers in Kerman in 2012]. Iran J Med Microbiol. 2014; 8(3): 15-21. [Article in Persian]
18. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2001 Oct; 39(10): 3781-84. doi: 10.1128/JCM.39.10.3781-3784.2001
19. Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS Performance standards for Antimicrobial disc diffusion tests; Approved standards. 9th ed. CLSI Document M2-M9. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
20. Miller SA, Dykes DD, Polsky HF. A simply salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb; 16(3): 1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
21. Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol Biol. 2009; 551:189-202. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4_15
22. Shakeri F, Shojai A, Golalipour M, Rahimi Alang S, Vaez H, et al. Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. Int J Microbiol. Volume 2010, Article ID 351397. http://dx.doi.org/10.1155/2010/351397
23. Rahimi H, Dastmalchi Saei H, Ahmadi M. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Frequency and Antibiotic Resistance in Healthy Ruminants. Jundishapur J Microbiol. 2015 Oct; 8(10): e22413. doi: 10.5812/jjm.22413
24. Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. [Detection of biocide resistance genes, qac A/B and smr, among isolated *Staphylococcus aureus* from clinical and non-clinical sources]. Pajoohande. 2011; 16 (2) :83-91. [Article in Persian]
25. Pournajaf A, Ardebili A, Goudarzi L, Khodabandeh M, Narimani T, Abbaszadeh H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. Asian Pac J Trop Biomed. 2014 May; 4(Suppl 1): S293-S297. doi: 10.12980/APJTB.4.2014C423
26. Khoei F, Mobaiyen H, Nahaei MR, Sadeghi Mohammadi S. Antibiotic Resistance Pattern and Frequency of mecA Gene in *Staphylococcus aureus* Isolated from Shohada Hospital, Tabriz. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases. 2014; 2(3): 105-108.
27. Gomes RMF, Bomfim MRQ, Trindade MJV, Farias LM, Santos SG. Potential Spread of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Recovered from Patients with Bloodstream Infection. Chemo Open Access. 2015; 4(2): 149. doi: 10.4172/2167-7700.1000149
28. Kim GY, Lee CH. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. J Periodontal Implant Sci. 2015 Dec; 45(6): 223-28. doi: 10.5051/jpis.2015.45.6.223
29. Naseer BS, Jayaraj YM. Identification of Multi-Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Specimens. Res J Med Sci. 2010; 4(3): 204-207. doi: 10.3923/rjmsci.2010.204.207
30. Khattak SU, Bacha N, Lutfullah G, Bakht J, Ali S, Ali J, et al. Study of the genetic traits associated with antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from skin wards of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(5): 393-98. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60803-3
31. Saderi H, Owlia P, Shahrbanooie R. Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Arch Iranian Med. 2005; 8(2): 100-103.