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]

تحقیقی

فراوانی ژن‌های *blaZ* و *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش PCR

یاسمن رهنما، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0001-9789-2153

*** دکتر آیلر جمالی**، دانشیار، مرکز تحقیقاتی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-4612-8144

دکتر تینا دادگر، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران. ORCID ID: 0000-0002-0839-0838

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. درمان عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس با حضور گونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین (Methicillin Resistant Staphylococcus aureus: MRSA) پیچیده‌تر شده است. mecA ژن کدکننده مقاومت به متی‌سیلین و blaZ ژن کدکننده مقاومت به آنزیم بتالاکتاماز است. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن‌های blaZ و mecA در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های بالینی با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی – تحلیلی ۵۹ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های شهر گرگان طی مدت شش ماه (از بهمن ۱۳۹۵ لغایت تیر ۱۳۹۶) جمع آوری شدند. ایزوله‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کوآگولاز، کاتالاز، Dnase و تخمیر قند مانیتول تعیین هویت شدند و با روش دیسک دیفیوژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارزیابی گردید. از روش یدومتری برای تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در این باکتری استفاده شد. سپس تشخیص ژن‌های mecA و blaZ با استفاده از روش PCR انجام گردید.*

یافته ها: *همه ۵۹ ایزوله (۱۰۰ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس برای ژن blaZ مثبت و به‌دنبال آن، ۲۷ ایزوله (٤۵/۸ درصد) دارای ژن mecA بودند که به‌طور همزمان ایزوله‌های دارای ژن mecA از لحاظ حضور ژن blaZ مثبت بودند. میزان ۵ درصد از ایزوله‌های مقاوم به اگزاسیلین و ۳ درصد از ایزوله‌های مقاوم به سفوکسی‌تین دارای ژن mecA بودند. ۷۹/٤ درصد از ایزوله‌های دارای ژن blaZ، در تست فنوتیپی بتالاکتاماز مثبت بودند.*

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

کلید واژه‌ها: *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 به‌عنوان فلور طبیعی بدن انسان روی پوست، در بینی افراد سالم و گلو ممکن است یافت شود (۱و۲).

استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی شامل باکتریمی، عفونت‌های زخم جراحی، پنومونی، اندوکاردیت، استئومیلیت و همچنین عفونت‌های بافت نرم از قبیل زرد زخم، سندرم پوستی فلسی شونده *استافیلوکوکی* (*staphylococcal* scalded skin syndrome)، سندرم شوک توکسیک و مسمومیت غذایی است (۵-۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن مهم برای انواع بیماری‌ها با منشا عفونت‌های پوستی و بافت نرم، مسمومیت غذایی تا بیماری‌های بسیار جدی مانند استئومیلیت و اندوکاردیت است (۶). *استافیلوکوکوس اورئوس* توانایی زیادی برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک ها دارد (۷). منابع اصلی *استافیلوکوک اورئوس* در عفونت های بیمارستانی ضایعات سپتیک و سایت‌های حمل و نقل بیماران و کارکنان هستند (۸). درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با حضور گونه مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) پیچیده‌تر شده است (۹). اولین *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در سال ۱۹۶۱ در انگلستان شناسایی شد (۳). تا ظهور پاتوژن‌های مقاوم به پنی‌سیلین در سال ۱۹۵۰، با کشف پنی‌سیلین در دهه ۱۹۴۰ به‌طور چشمگیری در درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بود. متی‌سیلین برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ به منظور درمان عفونت‌های ایجاد شده

به‌واسطه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به پنی‌سیلین معرفی شد. مقاومت به متی‌سیلین در MRSA به‌دلیل کسب ژن *mecA* است. این ژن یک پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین (Penicillin-Binding-Proteins: PBP2a) را با میل ترکیبی پایین به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام کد می‌کند. MRSA در سراسر جهان شایع است و به‌عنوان مهم‌ترین عامل عفونت‌های کسب شده از بیمارستان و کسب شده از جامعه ناشی از افزایش بیماری و مرگ و میر در محیط‌های بیمارستان بررسی می‌شوند (۱۰). ساز و کار مقاومت به بتالاکتام‌ها از بین بردن حلقه بتالاکتام در آنزیمی اختصاصی به نام بتالاکتاماز است. پروتئین‌های این آنزیم را ژن‌های متعددی کد می‌کند. یکی از این ژن‌ها، ژن *blaZ* است. ژن *blaZ* مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های 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 می‌کند که در میان باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* شایع است. آنزیم بتالاکتاماز حلقه بتالاکتام در آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از قبیل پنی‌سیلین را تجزیه می‌کند. به نحوی که ساختار تغییر یافته دارو نمی‌تواند اتصال مؤثری با PBP هابرقرار نماید و سنتز دیواره سلولی ادامه می‌یابد (۱۲). در مطالعه Jeshina و Surekha در سال ۲۰۰۹ در هند، ۷۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) بررسی شدند. گونه‌های مقاوم به متی‌سیلین که از لحاظ ژن *mecA* منفی بودند؛ حاوی ژن *blaZ* بودند که آنزیم بتالاکتاماز تولید می‌کنند. همه ۷۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند و ۱۰۰ درصد مقاومت به آمپی‌سیلین و اگزاسیلین نشان دادند و ژن *mecA* از ۸۸ درصد گونه‌ها جدا شد (۱۳). در تحقیقی از جمعه‌پور و رضایی‌منش در سال ۱۳۹۵ در تربت حیدریه حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی ۲۸ نفر (۲۱/۵ درصد) کارکنان بیمارستان گزارش شد. بیشترین مقاومت به پنی‌سیلین (۱۰۰درصد) و ۱۴ نمونه (۱۰/۸درصد) مقاومت به متی‌سیلین 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 می‌توان از روش مولکولار و ردیابی ژن‌های موردنظر استفاده کرد و از آنجا که در بازه زمانی این پژوهش مطالعه‌ای مشابه مطالعه حاضر در منطقه صورت نگرفته و بیشتر گزارشات آنتی‌بیوتایپینگ با تست‌های فنوتیپی ارایه شده است و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارگانیسم‌ها به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور چشمگیر در حال افزایش است؛ لذا این مطالعه به منظور تعیین فراوانی ژن‌های *blaZ* و *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های بالینی با استفاده از روش PCR انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی – تحلیلی در گروه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد.

جمع‌آوری نمونه و شناسایی اولیه: تعداد ۵۹ نمونه بالینی مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به عفونت‌های آبسه، خون، خلط، چشم، زخم و ادرار از بیماران و بینی افراد سالم مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر گرگان از بهمن ماه سال ۱۳۹۵ لغایت تیرماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری 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. ایزوله‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تست های کوآگولاز، کاتالاز، Dnase و تخمیر قند مانیتول تعیین هویت شدند (۱۶). نمونه‌ها با رضایت افراد شرکت‌کننده در مطالعه وارد گردید.

سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: با روش دیسک دیفیوژن از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین (یک میکروگرمی) و سفوکسی‌تین (۳۰ میکروگرمی)، شرکت روسکو کشور آمریکا برای تعیین مقاومت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به متی‌سیلین استفاده شد. بدین ترتیب که از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های آزمایشی سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس دیسک‌ها با فاصله استاندارد قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

براساس دستور کار مؤسسه استانداردهای آزمایشگاه بالینی (Clinical Laboratory Standards Institute: CLSI) قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بررسی شد (۱۶و۱۷). میزان مقاومت براساس قطر هاله عدم رشد برای اگزاسیلین کمتر مساوی ۱۰ میلی‌متر (۱۸) و برای سفوکسیتین کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر (۱۹) در نظر گرفته شدند.

سنجش ژنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: در ابتدا سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* برای استخراج DNA به محیط BHI Broth شرکت Merck کشور آلمان انتقال داده شدند. به روش فنل کلروفرم 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 سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Mastercycler personal /eppendorf کشورآلمان انجام شد. مخلوطی از ۱۲/۵ میکرولیتر ترکیب

مسترمیکس 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 گلوتامات سنتتاز sa۴۴۲ (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 SinaClonکشور ایران، ران شدند و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور زیر نور UVمشاهده شدند.

آنالیز آماری: داده ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 و آزمون کای‌اسکوئر در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

محدوده سنی آزمودنی ها 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 (۴۷درصد) 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 میکروگرمی)، 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*

جدول ۱ : مراحل PCR برای شناسایی ژن گلوتامات سنتتاز sa۴۴۲ (گونه اورئوس) در استافیلوکوک‌ها، شناسایی ژن mecA در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و شناسایی ژن blaZ در استافیلوکوکوس اورئوس

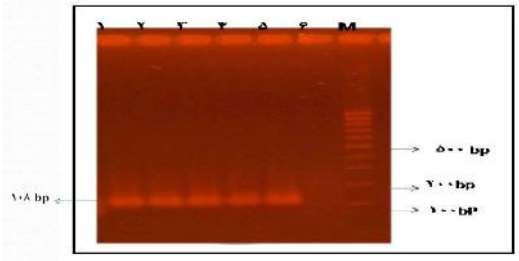
شناسایی ژن	مرحله	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
ژن گلوتامات سنتتاز sa۴۴۲ (گونه استافیلوکوکوس اورئوس)	واسرشته شدن اولیه	۳ دقیقه	۹۶
	واسرشته شدن (۴۰ سیکل)	۱ ثانیه	۹۵
	اتصال (۴۰ سیکل)	۳۰ ثانیه	۶۰
	تکثیر (۴۰ سیکل)	۳۰ ثانیه	۷۲
	تکثیر نهایی	۵ دقیقه	۷۲
ژن mecA در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین	واسرشته 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 blaZ 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

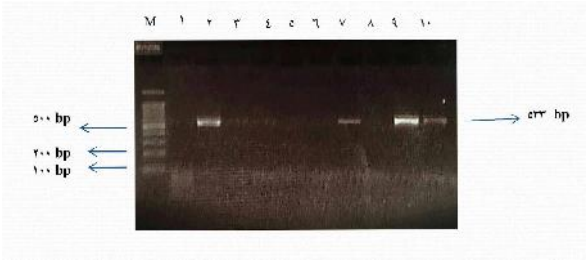
ژن		توالی نوکلئوتیدی (۵' ـ ۳')	اندازه محصول (bp)	رفرنس
glutamate synthetase sa442	F	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	۱۰۸	۲۱
	R	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA		
mecA	F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	۵۳۳	۲۲
	R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
blaZ	F	AAGAGATTTGCC TATGCTTC	۵۱۸	۲۳
	R	GCTTGACCACTT TTATCAGC		

مورد بررسی بتالاکتاماز مثبت و ۱۲ مورد (۲۰/۳درصد) از ایزولـه‌هـا بتالاکتاماز منفی در روش یدومتری هستند.

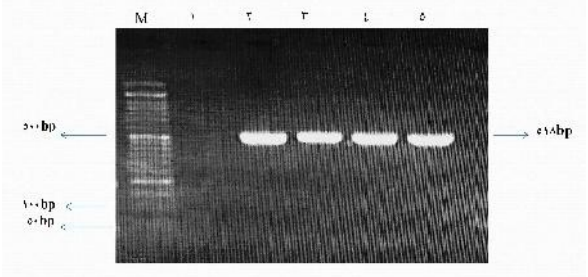
محصولات PCR در شکل‌های ۱و۲و۳ نشان داده شده است.



شکل ۱ : الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن گلوتامات سنتتاز sa۴۲ (طول باند ۱۰۸bp) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس
M : مارکر؛ ۱، ۲ ، ۳، ٤ و ٥ : نمونه‌های مثبت؛ ٦ : کنترل منفی



شکل ۲ : الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن mecA (طول باند ۵۳۳bp) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس
M : مارکر؛ ۱: کنترل منفی؛ ۳ ، ٤ ، ٥ ،٦ و ۸ : نمونه های منفی ۲ ،۷ ،۹ و۱۰ : نمونه‌های مثبت



شکل ۳ : الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی ژن blaZ (طول باند ۵۱۸ bp) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس
M : مارکر؛ ۱ : کنترل منفی؛ ۲ ، ۳ ، ٤ و ٥ : نمونه‌های مثبت

نتایج حاصل از تست PCR نشان داد که تمامی ۵۹ ایزولـه دارای ژن گلوتامات سنتتاز بودند و *استافیلوکوکوس اورئـوس* بـودن آنهـا بدین روش نیز تایید شد. از بـین ۵۹ نمونـه بـالینی، ۲۷ ایزولـه (۴۵/۸ درصد) دارای ژن *mecA* و ۳۲ مـورد (۵۴/۲درصـد) فاقـد ژن *mecA* بودند که در بین این ۲۷ مورد *mecA* مثبت، ۵ مورد از نـاقلین (۱۱/۴ درصـد) و ۲۲ مـورد در بـین بیمـاران (۱۵/۶ درصـد) مشـاهده شـد (جدول ۳) که به‌طور همزمان ایزوله‌های دارای ژن *mecA*، از لحاظ حضـور ژن *blaZ* مثبـت بودنـد و ارتبـاط آمـاری معنـی‌داری بـین همزمـانی ژن *mecA* بـا ژن *blaZ* در ایزولـه‌هـای *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* یافت شد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۳ : توزیع فراوانی ژن mecA در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب منبع جداسازی

منبع جداسازی	تعداد (درصد) مثبت (n=۲۷)	تعداد (درصد) منفی (n=۳۲)
بیمار	۲۲ (۱۵/٦)	۱۲ (۱۸/٤)
ناقل	٥ (۱۱/٤)	۲۰ (۱۳/٦)
p-value	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

جدول ٤ : توزیع ژن mecA در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس نوع نمونه بالینی

نمونه بالینی	تعداد (درصد) ژن mecA مثبت	ژن mecA منفی	p-value
حلق	٦ (٤/۷)	۲ (۳/۳)	۰/۰۰۱
چشم	۲ (۲/۳)	۳ (۲/۷)	۰/۰۰۱
خون	٥ (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	٦ (٦/٦)	٤ (۳/٤)	۰/۰۰۱
بینی	٥ (۱۱/٤)	۲۰ (۱۳/٦)	۰/۰۰۱

توزیع ژن *mecA* در نمونـه‌هـای بـالینی بـه ترتیـب حلـق ۶ مـورد (۴/۷درصـد)، چشـم ۲ مـورد (۲/۳ درصـد) ، زخـم یـک مـورد (۰/۹درصد)، ادرار ۶ مورد (۶/۶درصد)، خون ۵ مورد (۳/۲ درصد)، آبسه ۲ مورد (۰/۹درصد) و بینی ۵ مـورد (۱۱/۴درصـد) تعیـین شـد (جدول ۴). لذا بین حضور ژن *mecA* و منبع عفونـت در ایزولـه‌هـای *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* ارتبـاط آمـاری معنـی‌دار آمـاری وجـود داشـت (P<۰/۰۰۱). نتـایج فراوانـی ژن *mecA* در ایزولـه‌هـای *استافیلوکوکوس اورئـوس* جـدا شـده از بیمـاران و نـاقلین نسـبت بـه آنتی‌بیوتیک‌های بررسـی شـده نشـان داد کـه ۵ مـورد (۵درصـد) از ایزوله‌های مقاوم به اگزاسیلین و ۳ مـورد (۳ درصـد) از ایزولـه‌هـای مقاوم به سفوکسی‌تـین دارای ژن *mecA* بودنـد. لـذا ارتبـاط آمـاری معنی‌داری بین همزمانی ژن *mecA* در ایزوله‌هـای MRSA در روش دیسـک دیفیـوژن وجـود داشـت (P<۰/۰۵). همـه ایزولـه‌هـای *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۵۹ نمونـه بـالینی (۱۰۰درصـد)، دارای ژن *blaZ* بودند و همچنین ۴۷ ایزوله (۷۹/۴ درصد) حامـل ژن *blaZ* در روش یدومتری بتالاکتاماز مثبت بودند. لذا بین حضـور ژن *blaZ* و تولید بتالاکتاماز در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئـوس* ارتبـاط آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵).

بحث

بـا توجـه بـه نتـایج ایـن مطالعـه، ۱۰۰ درصـد ایزولـه‌هـای *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۵۹ نمونه بـالینی دارای ژن *blaZ* بودنـد و از بین ۵۹ نمونه بـالینی، ۴۵/۸درصـد دارای ژن *mecA* بودنـد و در این بین ۱۱/۴ درصد در ناقلین و ۱۵/۶ درصد در بیماران مشاهده شد که به‌طور همزمان ایزوله‌های دارای ژن *mecA* از لحـاظ حضـور ژن

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 اگزاسیلین و ۳ درصد از ایزوله‌های مقاوم به سفوکسی‌تین حامل ژن *mecA* بودند و نیز ۷۹/۴ درصد ایزوله ها 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، ۴۵/۱درصد ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *mecA* مثبت بود که مشابه یافته مطالعه حاضر است و میزان شیوع MRSA با روش دیسک دیفیوژن اگزاسیلین ۴۷/۶درصد گزارش شد (۲۵). همچنین خوئی 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*، MRSAگزارش شد و ۱۰ سویه (۸/۸ درصد) از ۱۱۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۱۱ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین گزارش شدند. ۸۸ سویه از ۹۰ سویه MRSA، ژن *mecA* را حمل نموده و همه ۱۰ ایزوله مقاوم به ونکومایسین برای ژن‌های *mecA* و *vanA* مثبت بودند (۹). در مطالعه Gomes و همکاران در کشور برزیل تعداد ۵۶ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین 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 Kim و Lee 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 Naseer و Jayaraj در کشور هند، از بین ۳۶۰ سویه، فقط ۷ سویه مقاوم به ونکومایسین (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 حساسیت را به ایمی‌پنم داشتند. ۱۰۰ درصد سویه‌ها به پنی‌سیلین بالاترین مقاومت را نشان دادند و ۲۹ درصد ایزوله‌ها به متی‌سیلین مقاوم بودند. ۱۳ مورد از ۱۴ سویه مقاوم به متی‌سیلین ژن *mecA* مثبت گزارش شد. ویژگی‌های ژنتیکی *blaZ* در همه ایزوله‌های مقاوم به پنی‌سیلین 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. به‌طوری که نتایج مطالعه صادری و همکاران نشان داد مقاومت به آنتی بیوتیک‌های 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 می‌گرددکه قبل از استفاده از آنها از تست آنتی‌بیوگرام استفاده شود. به‌نظر می‌رسد انجام تست PCR در سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین و سفوکسی‌تین در تشخیص تولیدکننده‌های بتالاکتاماز در ارگانیسم‌ها ضروری بوده و با انجام این آزمایش می‌توان گزارش صحیح‌تری ارایه 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 میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان و نیز از کارشناسان محترم آزمایشگاه مولکولی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به‌دلیل همکاری در اجرای این مطالعه صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References

1. 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

2. Mah FS, Davidson R, Holland EJ, Hovanesian 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

3. 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

4. Nwokah EG, Abbey SD, Wachukwu CK. mecA Gene Profile of Methicillin-Resistant StaphylococcusaureusIsolates 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 Scineces. 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 mecAand vanAPositive 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, Eftekhar F. [Studying the presence of blaZ gene and β-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. Molecclar 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 TorbatHeydariyeh hospitals staff in 2013]. Journal of Tanin Salamat (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-1Gene in methicilin-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, Sharifmoghadam 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, Saeidadeli 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 outprocedure 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.