



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

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 از جمله بتالاکتام‌ها کسب کرده است. بتالاکتام‌ها آنتی‌بیوتیک‌های 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 به صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه انتقال داده شد. در ایزوله‌های بالینی تأیید شده 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 به وسیله نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۴ تجزیه و تحلیل 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

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



مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی و همچنین پاتوژن‌های مهم اکتسابی از اجتماع می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول بیماری‌هایی از جمله سندرم شوک سمی، سندرم فلسی شدن پوست، عفونت‌های دستگاه ادراری، باکتری می و سندرم شوک سپتیک می‌باشد. استافیلوکوکوس‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت با ابعاد $(0.5-1/5nm)$ می‌باشند که به صورت 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 به راحتی در اغلب محیط‌های کشت، در شرایط هوازی یا بی‌هوازی رشد می‌کنند. منابع عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور عمده شامل انتشار باکتری از زخم‌ها، ترشحات آلوده زخم‌ها، دستگاه تنفسی و پوست می‌باشد. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، 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 بستری شده، افزایش مدت‌زمان بستری بیماران در بیمارستان‌ها و افزایش هزینه‌های بیمه‌های درمانی گردیده و این مسئله پزشکان را جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس با محدودیت‌های بسیاری مواجه کرده است. پردردسرت‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، متعلق به بتالاکتام‌ها

می‌باشد. (۲). بتالاکتام‌ها، آنزیمی است که بصورت غیرکووالانت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باند می‌کند و با تشکیل یک پیوند کووالانت، سبب هیدرولیز باند آمیدی حلقوی حلقه لاکتام و آزاد شدن آنتی‌بیوتیک تغییر یافته (غیرفعال) می‌گردد. پروتئین‌های این آنزیم را ژن‌های متعددی کد می‌کنند. یکی از این ژن‌ها، ژن *blaZ* است (۳). بتالاکتام‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، با *PBP* ها رقابت می‌کنند. امروزه بیشتر از ۱۰۰ نوع بتالاکتام 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 سوآپ استریل از بینی و حلق بیماران بستری در بیمارستان‌های فاطمیه و سینا در شهر همدان به صورت 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



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 استافیلوکوک‌ها 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 (Oxidation and Fermentation) OF 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 ۱۸-۲۴ ساعته باکتری‌های رشد یافته در محیط نوترینت آگار سوسپانسیون با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع مولر هینتون تهیه و با سوآپ استریل

روی سطح مولر هینتون 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 ۱۸-۲۴ 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/ورئوس 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 سانتی‌گراد 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 برات (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).



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

ژن های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (جفت باز)	رفرانس
<i>blaZ</i>	<i>blaZ (F,R)</i>	TACAACGTGAATATCGGAGGG AGGAGAATAAGCAACTATATCATC	۳۱۰	(۹)

Inert red dye and Ampliqon Taq DNA polymerase (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).

سپس میکروتیوب‌های استریل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (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 (شرکت Ampliqon، آلمان) آماده شد (محتویات مسترمیکس شامل 5, (NH₄)₂SO₄, 3mM.Tris-HCl pH=8، 0.2 units/μl، 4mM dNTPs، 0.2 % Tween 20، 0.2 MgCl₂، 0

جدول ۲- سیکل دمایی انجام واکنش PCR برای ژن های مورد نظر

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

از 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 $P < 0.05$ 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

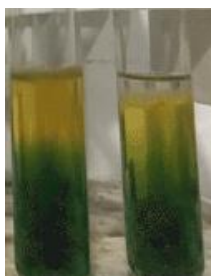
الکتروفورز فرآورده‌های حاصل از (PCR): پس از تهیه ژل آگارز ۱٪ با بافر TBE تهیه شده با غلظت ۰/۵ درصد، ۶ میکرولیتر از محصول نهایی PCR به همراه رنگ مخصوص ژل‌گذاری به نسبت ۱ به ۱ در چاهک‌های ژل ریخته و به مقدار ۲ میکرولیتر از مارکر ۱۰۰ bp فرمنتاز (شرکت Thermofisher، آمریکا) به عنوان خط‌کش DNA در چاهک اول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

پنج میکرولیتر رنگ TMEURx-Simplysafe هنگام تهیه ژل به آن اضافه شد. نتیجه نهایی با دستگاه Gel



آگار موجب تغییر رنگ محیط از قرمز 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).

بیماران بستری مورد مطالعه $1/2 \pm 44/8$ سال محاسبه گردید. ارتباطی بین سن و فراوانی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی وجود نداشت ($P > 0/05$). براساس آزمون T-test انجام شده، میانگین رشد باکتری در مردان بیشتر از زنان است ($P < 0/05$). کلیه سویه‌های گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، DNase مثبت که بر روی مانیتول سالت



شکل ۱- نتیجه تست OF استاف اورئوس و تغییر رنگ محیط کشت (سبز به زرد)

سفازولین ($30 \mu\text{g}$) با ۱۰ درصد مقاومت به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را داشت (شکل ۲).

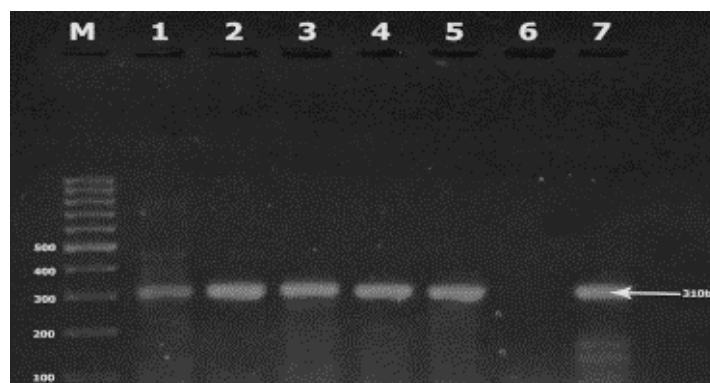
الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دست آمده نیز به این صورت بود که پنی‌سیلین ($10 \mu\text{g}$) با ۱۰۰ درصد مقاومت و



شکل ۲- نتایج تست آنتی بیوگرام روی پلیت

مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف متفاوت است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار است ($p < 0/05$). از مجموع ۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی، ۴۴ (۸۸ درصد) ایزوله حاوی ژن بتالاکتاماز بودند (شکل ۳).

همچنین ۹۴ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سفوکسیتین ($30 \mu\text{g}$) و ۹۰ درصد ایزوله‌ها به اوگزاسیلین ($1 \mu\text{g}$) مقاوم بودند و همچنین ۷۲ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سفتریاکسون و ۶۴ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سفالکسین و در آخر ۵۰ درصد ایزوله‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. با توجه به آنالیز (ANOVA) میانگین تعداد افراد حساس، نیمه مقاوم و



شکل ۳- نتیجه الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد ژن *blaZ*؛ چاهک M مارکر ۱۰۰ bp، 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 آنتی‌بیوتیک سفازولین (۵ درصد) بود که با مطالعه 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 مورد مطالعه بودند که با



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 داده‌های 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 پنی‌سیلین، 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 پنی‌سیلین 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 آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و سفالکسین نشان دهنده مصرف بیش از حد 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 پنی‌سیلین

شناسایی می‌شود. همچنین، از روش تعیین حداقل غلظت مهار (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 آماری استفاده شود یا تست‌های انجام شده با کاربردهای مناسب‌تری ارائه شود.

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



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 عملاً 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 جدا شده 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 ژن‌های 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 منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

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, Eftekhari 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, Jerriss 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. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. (2005), Volume 1, chapter 116, 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, Tahaghoghi S. The Antibiotic Resistance Pattern of Staphylococcus aureus Isolated From Patients in Quam 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 coagulase-negative 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.



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.



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

ABSTRACT

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.