NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/44 , 2021

Scan online to view this article

A Survey of presence of accessory gene regulator (*agr*) in sensitive and methicillin-resistant (*mecA*) *Staphylococcus aureus in* clinical samples of Bojnurd, Northeastern Iran

Parastoo Zarghami Moghaddam[1], Amir Azimian[2,*], Abbas Akhavan Sepahi[3], Alireza Iranbakhsh[1]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University Medical Sciences, Bojnurd, Iran
3. Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: *Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogens in humar The development of resistance to various antibiotics in this bacterium has become a global proble that due to the importance *accessory gene regulator* (*agr*) in this bacterium, which is responsible f coordinating and controlling the production and secretion of toxins and virulence factors. The purpo of this study was to investigate the pattern of antibiotic resistance and determine specific groups *a* in order to find the dominant type of region in sensitive and methicillin-resistant *Staphylococc aureus*.

Materials and methods: Different clinical samples were prepared of Clients to Imam Re Hospital in Bojnourd and phenotypic tests were performed on *Staphylococcus aureus* strains. Di diffusion method was used to confirm drug sensitivity. DNA extraction was performed using QiaAmp kit and Methicillin-resistant strains with *mecA* gene were identified by polymerase cha reaction (PCR) and *agr* groups were determined by multiplex PCR.

Results: In this study, the highest antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* against cefoxit was (75%). Isolates (73. %) have *mecA* gene and in sensitive and methicillin resistant strains tl highest percentage belongs to *agrI* group with frequency of 60.71% and 15.58%.

Conclusion: Due to the fact that the pathogenicity of strains belonging to *agr* groups different in various regions, it is necessary to determine the strains isolated from each regic in order to find the dominant type in that region.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *agr* genes, Methicillin-resistance, *mecA* gene, Iau Scienc

Corresponding author:
Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University Medical Sciences, Bojnurd, Iran
Email: amir_azimian2003@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی حضور ژن تنظیم کننده فرعی (*agr*) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم‌به متی‌سیلین (*mecA*) جدا شده از نمونه‌های بالینی بجنورد، شمال شرق ایران

پرستو ضرغامی مقدم[۱]، امیر عظیمیان*[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]، علیرضا ایرانبخش[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان‌ها محسوب می‌گردد که بروز مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در این باکتری به معضلی جهانی تبدیل شده که با توجه‌به اهمیت ژن تنظیم کننده فرعی که مسئول هماهنگی و کنترل تولید و ترشح توکسین‌ها و فاکتورهای ویرولانس در این باکتری است. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین فراوانی گروه‌های اختصاصی *agr* به‌منظور یافتن گروه غالب در منطقه در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های بالینی مختلف از مراجعین به بیمارستان امام رضا (ع) بجنورد تهیه و تست‌های فنوتیپی برای جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد. جهت تأیید حساسیت دارویی از روش انتشار از دیسک استفاده گردید. با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سویه‌های مقاوم‌به متی‌سیلین دارای ژن *mecA* شناسایی و تعیین گروه‌های *agr* توسط Multiplex PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: در این بررسی بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر سفوکسیتین (۷۵٪) مشاهده شد، ۷۳/۰۵٪ ایزوله‌ها دارای ژن *mecA* و در سویه‌های حساس و مقاوم‌به متی‌سیلین بیش‌ترین درصد مربوط به گروه *agrI* با فراوانی ۶۰/۷۱٪ و ۱۵/۵۸٪ بود.

نتیجه‌گیری: ازآنجایی‌که بیماری‌زایی سویه‌های متعلق‌به گروه‌های اختصاصی *agr* در مناطق گوناگون متفاوت است، ضروری است که سویه‌های جدا شده از هر منطقه جهت یافتن تیپ غالب تعیین تیپ گردند.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های *agr* مقاومت‌به متی‌سیلین، ژن *mecA* ، Iau Science.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس[۱] به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای باکتریایی در انسان‌ها ده‌ها سال است منشاء عفونت‌های برگرفته از جامعه و بیمارستان است که به‌علت مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضدباکتریایی، به یکی از نگرانی‌های اصلی سلامت عمومی تبدیل شده و به‌عنوان دومین پاتوژن شایع در عفونت بیمارستانی به یک چالش و معضل درمانی در بیمارستان‌های سراسر جهان مبدل شده است که روز به‌روز از تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر برای درمان این عفونت‌ها کاسته می‌شود. از انواع خطرناک عفونت‌های استافیلوکوکی باکتریمی، پنومونی،

نویسنده مسئول:
گروه پاتوبیولوژی و علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.
پست الکترونیکی: amir_azimian2003@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۷

[1] *Staphylococcus aureus*

استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک توکسیک را می توان نام برد. (۲،۱). تجویز زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پزشکان و استفاده ناصحیح توسط بیماران باعث شیوع سویه‌های مقاوم در جامعه شده است که می‌توان با درمان مناسب و به‌موقع از به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم و انتشار در جمعیت‌های انسانی جلوگیری به‌عمل آورد (۳). مکانیسم اصلی مقاومت‌به متی‌سیلین در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با تولید پروتئین جدیدی به نام PBP2a توسط ژن‌های *mec* موجود در کروموزوم باکتری مرتبط بوده است که این پروتئین میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها داشته و سبب مقاومت‌به بتالاکتام ها می‌گردد. در باکتری حساس فاقد این ژن، آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین با میل ترکیبی بیش‌تری به PBP2a در دیواره سلول باکتری متصل می‌شود که سبب لیز دیواره سلول و سرانجام مرگ باکتری می‌گردد (۲). در میان ژن‌های مرتبط با ویرولانس باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن تنظیم کننده فرعی (*agr*) سنتز بسیاری از فاکتورهای ویرولانس را در طی رشد باکتری بر عهده داشته و بیان پروتئین‌های وابسته‌به دیواره سلولی و خارج سلولی که در اتصال باکتری به میزبان نقش داشته به‌وسیله این لوکوس کنترل می‌شود. این سیستم از یک لوکوس وابسته‌به تراکم سلول باکتری[۲] و هم‌چنین بخش ترشح پپتید خودالقاگر[۳] تشکیل شده که به جمعیت باکتری امکان رسیدن به یک غلظت آستانه یا بحرانی را می‌دهد. لوکوس *agr* از دو واحد رونویسی مختلف تشکیل شده که توسط پروموتورهای P2 و P3 از هم متمایز می‌شوند. اپرون P2 مسئول کد کردن چهار پروتئین *agr (A-B-C-D)* است. *استافیلوکوکوس اورئوس* را می‌توان براساس تفاوت در توالی ژن *agrC* که کد کننده گیرنده پپتید خودالقاگر و ژن *agrD* که کد کننده پپتید خودالقاگر است به چهار گروه *agrI*، *agrII*، *agrIII* و *agrIV* تیپ‌بندی نمود. بررسی‌ها نشان داده که هر ایزوله استافیلوکوک فقط دارای توالی مربوط به یکی از این گروه‌ها است. استافیلوکوک‌های مناطق مختلف دارای الگوهای مختلف بوده و این الگو از شهری به شهر دیگر و حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت است. از آنجایی‌که سیستم agr باعث بیان ژن‌های متنوع متابولیسمی، ژن-های اسپورولاسیون، ژن‌های ویرولانس و سایر ژن‌های مورد نیاز برای بقا باکتری می‌شود، می‌توان با قطع عمل ترانسداکشنال سیگنال‌ها از بروز این ژن‌های ویرولانس کاست (۴). لذا با توجه‌به اهمیت ژن ساختاری *agr*، بررسی فراوانی گروه‌های مختلف این ژن در شمال شرق ایران به کمک روش Multiplex PCR جهت شناسایی گروه غالب منطقه و مقایسه آنها با تیپ‌های رایج سایر نقاط ایران و آسیا در سویه‌های دارای ژن مقاومت و حساس‌به متی‌سیلین ضروری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این پژوهش بر روی نمونه‌های بالینی (خلط، خون، زخم، آبسه، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل، بافت، کاتتر، پریتوئن، برونش گلو، چشم، مایع سینوویال، بینی، تراشه) گرفته شده از بیماران سرپایی و بستری در بیمارستان امام رضا (ع) شهرستان بجنورد در طی بازه زمانی پنج ساله (۱۳۹۷-۱۳۹۲) صورت گرفته است.

تست‌های فنوتیپی

تست‌های تأییدی

تأیید ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روش‌های فنوتیپی استاندارد آزمایشگاهی (رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کواگولاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار، DNase) انجام شد. ایزوله‌ها پس از تأیید توسط آزمایش‌های ذکر شده برای انجام مراحل بعدی در محیط Skim milk براث نگهداری گردیدند.

روش دیسک دیفیوژن

در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل با کدورت نیم‌مک فارلند از نمونه‌های تأیید شده، آن‌ها را بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت نموده و سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک (پادتن طب، ایران پادتن طب ایران و MASTDISCS, UK) ونکومایسین[۴] (۳۰ میکروگرمی)، سفوکسیتین[۵] (۳۰ میکروگرمی)، سیپروفلوکسازین[۶] (۵ میکروگرمی)، تتراسیکلین[۷] (۳۰ میکروگرمی)، کوتریموکسازول[۸] (۱۲،۵ میکروگرمی)،

[2] Quorum sensing
[3] Auto inducer peptide

[4] V: Vancomycin
[5] FOX: Cefoxitin
[6] CP: Ciprofloxacin
[7] TE: Tetracycline
[8] SXT: Co-trimoxazole

جنتامایسین[9] (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین[10] (۲میکروگرم) و ریفامپین[11] (۳۰ میکروگرمی)، به‌وسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مقاومت یا حساسیت براساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. از سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت و سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 موجود در بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۵).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[12]) آنتی-بیوتیک اگزاسیلین به‌روش آگار دایلوشن

در این تست روش آگار دایلوشن برای انجام MIC استفاده گردید. ابتدا محیط مولر هینتون اگار (مرک، آلمان) حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین تهیه و از کشت ۱۸ ساعته باکتری مقدار ۱۰ میکرولیتر (10^7 CFU/ml) به‌صورت نقطه بر روی محیط کشت داده شد و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت پلیت-ها از غلظت کم‌تر به بیش‌تر بررسی شده و اولین پلیتی که هیچگونه رشدی از باکتری در آن مشاهده نشود به‌عنوان MIC گزارش گردید (۶).

تست‌های ژنوتیپی

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های ایزوله شده با استفاده از کیت (QiaAmp DNA Mini Kit Cat) شرکت QIAGENE آلمان انجام شد. کلنی ایزوله‌ها به محیط کشت LB[13] براث (مرک آلمان) تلقیح شد و سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ صورت گرفت. بر روی رسوب حاصله ۳۰ µg / ml از بافر لیزکننده لیزواستافین اضافه و به‌مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول‌های ذکر شده در پروتکل الصاقی افزوده و به-مدت۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس با افزودن اتانول و سانتریفوژ نمودن آن و اضافه نمودن اتانول ۷۰ درصد و بیرون ریختن مواد رویی DNA استخراج شده رسوب نمود. بافر حل کننده به رسوب DNA اضافه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷).

واکنش PCR برای تشخیص ژن مقاومت

برای تأیید *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم‌به متی-سیلین، بررسی تمام ایزوله‌ها از نظر وجود ژن *mecA* به-روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. مخلوط نهایی واکنش شامل۰/۸ میکرولیتر از هر جفت پرایمر (۱۰ pmol)،۱۲/۵ میکرولیتر، ۵ میکرولیتر DNA الگو که با آب دیونیزه به حجم رسید. مخلوط در دستگاه ترموسایکلر به تعداد ۴۰ سیکل قرار داده شد: مرحله واسرشت اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°c، مرحله واسرشت به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ^{o}c ۹۴، مرحله اتصال به‌مدت ۴۵ ثانیه در دمای ^{o}c ۵۷، مرحله گسترش به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ^{o}c ۷۲ و مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}c ۷۲ انجام شد. کنترل مثبت سویه *Staphylococcus aureus* ATCC43300 انتخاب گردید. برای بررسی محصول PCR از روش الکتروفورز به‌وسیله ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده و بعد از رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مشاهده شد (۷).

agr تایپینگ

تعیین تیپ‌های *agr* با روش Multiplex PCR برای تمام نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲ انجام شد. فرآیند PCR از طریق تهیه مخلوطی به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید که ۲/۵ واحد آنزیم Taq pol، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲/۵ میکرومول کلرید منیزیم، ۱۰ میکرولیتربافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۲۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها به‌کار برده شد. سپس این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر به تعداد ۳۰ سیکل قرار داده شد: مرحله واسرشت اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای^{o}c ۹۴، مرحله واسرشت به‌مدت ۶۰ ثانیه در دمای ^{o}c ۹۴، مرحله اتصال به‌مدت ۶۰ ثانیه در دمای ^{o}c ۵۷، مرحله گسترش به‌مدت ۶۰ ثانیه در دمای^{o}c ۷۲ و مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}c ۷۲ انجام شد. برای بررسی محصول PCR از روش الکتروفورز به‌وسیله ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ حدود ۱۱۰ ولت به-

[9] GM: Gentamicin
[10] CC: Clindamycin
[11] RA: Rifampin
[12] Minimum inhibitory concentration
[13] Luriabroth

مدت تقریبی یک ساعت استفاده شد و بعد از رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مشاهده شد(۶).

نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک و MIC

در بین ۳۰۸ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ابتدا در برابر آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین (۷۵/۳٪) و سپس در برابر کلیندامایسین (۵۹/۴٪) و جنتامایسین (۵۷/۷٪) مشاهده شد (نمودار ۱) . کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به ونکومایسین (۴ نمونه) ثبت گردید و اکثریت سویه‌ها (۹۸/۷٪) در برابر این آنتی-بیوتیک حساس مشاهده شدند. در بررسی آماری مشخص شد که ارتباط معناداری بین میزان مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک های مورد استفاده وجود دارد (p< ۰/۰۵). نتایج تعیین میزان MIC متی‌سیلین نیز نشان داد که فقط دو نمونه (MIC=۴) میکروگرم بر میلی‌لیتر داشته و ۲۳۰ نمونه دیگر مقاومت کامل به متی‌سیلین را از خود نشان دادند.

واکنش PCR جهت تشخیص ژن *mecA*

بررسی حضور ژن *mecA* بر روی تمامی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده توسط PCR صورت گرفت که از این تعداد ۲۲۵ ایزوله دارای ژن *mecA* و ۸۳ ایزوله نیز فاقد این ژن مشاهده شدند (شکل ۱).

مقایسه نتایج روش دیسک دیفیوژن، MIC و PCR ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقایسه نتایج به‌دست آمده نشان داد که در روش‌های فنوتیپی دیسک دیفیوژن و MIC از بین ۳۰۸ ایزوله جداسازی شده *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲۳۲ ایزوله نسبت‌به دیسک سفوکسیتین مقاومت نشان دادند و MIC تمامی آن‌ها ۴≤ MIC ثبت گردید ولی در مطالعه ژنوتیپی ایزوله‌ها در روش PCR تعداد ۲۲۵ ایزوله دارای ژن *mecA* بودند. نتایج حاصل از روش‌های ژنوتیپی و فنوتیپی مورد استفاده در این تحقیق، ۷ سویه با هم اختلاف داشتند که پنج ایزوله علی‌رغم مقاومت‌به سفوکسیتین در روش فنوتیپی فاقد ژن *mecA* در روش PCR بوده و دو سویه دیگر نیز در روش دیسک دیفیوژن و MIC نسبت‌به سفوکسیتین حساس ولی دارای ژن *mecA* بودند (جدول۳). آنالیز نتایج در آزمون آماری کای دو نشان داد که اختلاف معناداری بین نتایج حاصل از سه روش دیسک دیفیوژن، MIC و PCR در بین سویه‌های مقاوم و حساس به متی‌سیلین وجود ندارد (p>۰/۰۵).

نتایج PCR برای تعیین گرو ه‌های *agr*[14] در ایزوله-های MRSA و MSSA

نتایج فراوانی گروه‌های *agr* در نمودار ۲ قابل مشاهده است که بیش‌ترین فراوانی در گروه *agr*I در ایزوله‌های MRSA (۶۰/۷۱٪) و MSSA (۱۵/۵۸٪) ثبت گردید که با بالاترین مقدار (۱۹/۴۸٪) در نمونه‌های زخم مشاهده شد و بعد از آن متعلق‌به گروه III *agr* در MRSA (۷/۷۹٪) در MSSA (۳/۸۹ ٪) ثبت گردید. آنالیز آماری بین گروه‌های *agr* شناسایی شده در بین نمونه‌های حساس و مقاوم نشان داد که اختلاف معناداری بین این پنج گروه در ایزوله‌های MRSA و MSSA وجود دارد (p< ۰/۰۵).

بحث

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ایجاد بیماری‌های متنوع در انسان‌ها موجب تهدید سلامتی آن‌ها به‌همراه مشکلات اقتصادی جدی شده که شناسایی ژن‌های مرتبط با ویرولانس این باکتری از جمله ژن تنظیم کننده *agr* که سنتز بسیاری از فاکتورهای ویرولانس و تنظیم بیان پروتئین‌های وابسته‌به دیواره سلولی را در طی رشد باکتری بر عهده دارد ضروری به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری بیماری‌زای شایع جهت هدایت درمان‌های تجربی و اختصاصی آن حائز اهمیت است که در ادامه به بررسی چندین مطالعه پرداخته می‌شود: Hassanzadeh در تهران با استفاده از روش دیسک دیفیوژن از بین ۱۲۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های خون، سواب زخم، ادرار و خلط، ۶۰ مورد MRSA جداسازی نمودند که در این مطالعه بیش‌ترین مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و اریترومایسین گزارش شد (۸). در این بررسی کار بر روی تعداد نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌تر در بازه زمانی پنج ساله صورت گرفت که با روش دیسک دیفیوژن، ۲۳۲ مورد MRSA شناسایی و بیش‌ترین

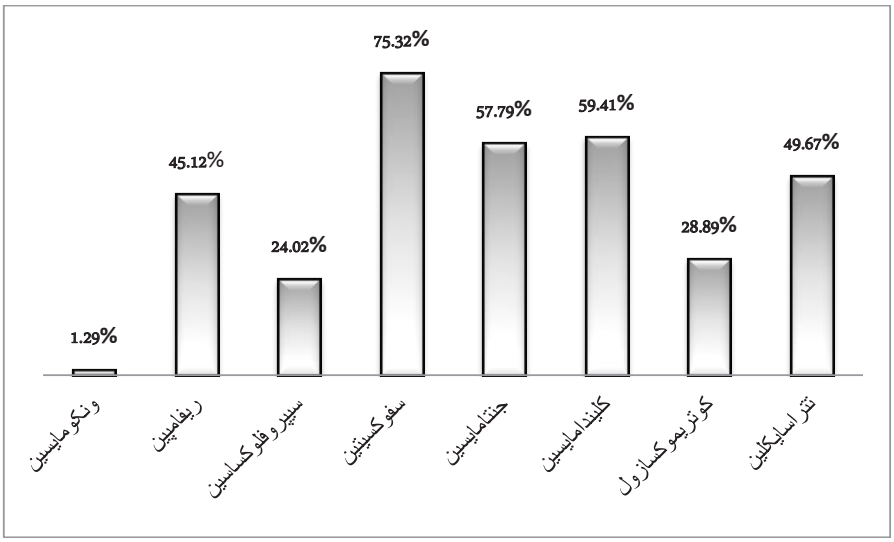
[14] Accessory gene regulator

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن *mecA*

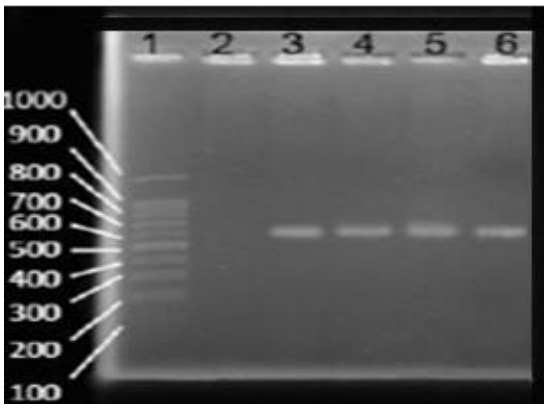
ژن	مشخصات پرایمر	اندازه
mecA	*mecA* F 5'-AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG-3	583bp
	mecA R 5'-ATGTATGTGCGATTGTATTGC-3'	

جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تیپ‌بندی ژن*agr*

نام پرایمر	مشخصات پرایمر	اندازه
forward pan *agr*	5'- ATGCACATGGTGCACATGC-3'	-
reverse *agr*I	5'- GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3'	۴۳۹ bp
reverse *agr*II	5'- GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC-3'	۵۷۲ bp
reverse *agr*III	5'- CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC-3'	۴۰۶ bp
reverse *agr*IV	5'- CGATAATGCCGTAATACCCG-3'	۶۵۷ bp



نمودار ۱. مقایسه مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک

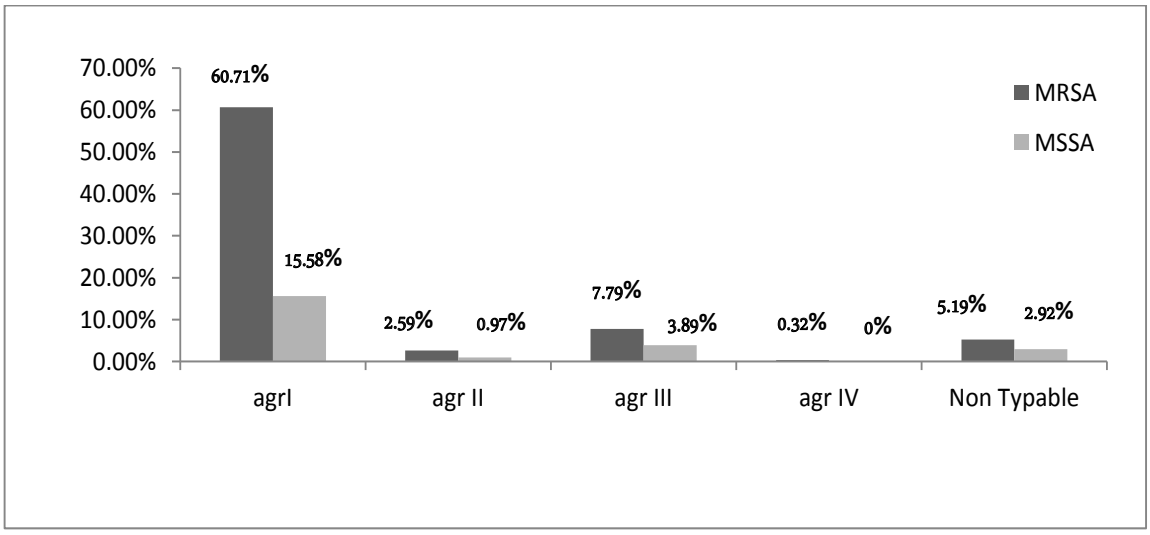


شکل ۱. محصول PCR ژن *mecA* بر روی ایزوله‌های بالینی

در شکل ۱ باند ۵۸۳ جفت بازی حاصل از PCR ژن *mecA* مشاهده می‌گردد. در چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ کنترل مثبت و سایر چاهک‌ها نمونه های دارای ژن *mecA* قابل مشاهده است.

جدول۳. مقایسه نتایج روش دیسک دیفیوژن، MIC و PCR در سویه‌های MRSA و MSSA

حساسیت	دیسک دیفیوژن	MIC	PCR(*mecA*)	P value
MRSA	(٪۷۵)	(٪۷۵)	(٪۷۳)	۰/۰۷۵
MSSA	(٪۲۴)	(٪۲۴)	(٪۲۶)	۰/۰۷۵



نمودار ۲. درصد فراوانی گروه های اختصاصی *agr* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی سیلین

مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، کلیندامایسین و جنتامایسین ثبت شد. در مطالعه Zamani و همکاران، درصد مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در میان ایزوله‌های MRSA، به‌ترتیب پنی‌سیلین ۱۰۰٪، تری متوپریم سولفومتوکسازول ۶۸/۵٪، تتراسایکلین ۷۴/۲٪، سفالوتین ۵۴/۷٪، اریترومایسین ۶۸/۵٪ و ریفامپین ۱۱/۴٪، جنتامایسین ۴۲/۸ ٪ گزارش شد (۹). مقایسه نتایج آنتی-بیوگرام در بررسی Zamani با این تحقیق نشان داد که در مطالعه ما درصد مقاومت ایزوله‌ها به کوتریموکسازول و تتراسایکلین کم‌تر و در مقابل مقاومت‌به ریفامپین و جنتامایسین از نتایج مطالعه زمانی بیش‌تر بود. نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی Shokri و همکارانش که بر روی ۱۷۶ نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان انجام شده بود نشان داد که سویه‌ها بیش‌ترین مقاومت را نسبت‌به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰٪) و گلوکزاسیلین (۸۰/۷۶٪) و کم‌ترین میزان را نسبت‌به ونکومایسین (۷/۶۹٪) داشتند (۱۰). در مطالعه Shokri نیز همانند تحقیق ما کم‌ترین میزان مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین نسبت داده شد که حاکی از مؤثر بودن این آنتی‌بیوتیک در درمان سویه‌های مقاوم‌به متی-سیلین در مناطق مورد مطالعه آن‌ها است. در بررسی سه ساله Ramoz و همکاران تعداد ۱۸۲ نمونه بالینی از بیماران بستری در بیمارستان شهداء تبریز از نظر مقاومت آنتی-بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دو روش دیسک آگار دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های اگزاسیلین و سفوکیستین و روش غربالگری با اگزاسیلین با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌کار گرفته شد، نتایج به‌دست آمده از آزمایش آنتی‌بیوگرام آن‌ها نشان دادند که بیش‌ترین میزان حساسیت به کلیندامایسین (۸۶٪) و کم‌ترین میزان حساسیت به سفوکسیتین (۱۸٪) بوده و میزان مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (۲۶/۴٪) گزارش شد (۱۱). مقایسه نتایج ما با یافته‌های Ramoz حاکی از تفاوت در میزان حساسیت به کلیندامایسین (۴۱٪)، سفوکسیتین (۲۴٪)، تعداد نمونه و بازه زمانی مورد بررسی و سایر شرایط جغرافیایی بود که تأثیر قابل توجهی برروی نتایج حاصل داشت. در مطالعه Rezazadeh و همکاران در شهر اراک، فراوانی سویه‌های MRSA با روش انتشار از دیسک اگزاسیلین و سفوکسیتین و نیز روش PCR، به‌ترتیب ۷۵، ۸۵ و ۸۳ درصد ثبت شد و از میان ۸۵ درصد از سویه‌های مقاوم‌به دیسک سفوکسیتین، ۳ سویه از آن‌ها فاقد ژن *mecA* بودند که بررسی نتایج آن‌ها حاکی از عملکرد بهتر دیسک سفوکسیتین نسبت‌به اگزاسیلین در شناسایی سویه-های مقاوم‌به متی‌سیلین بود (۱۲). در مطالعه ما نیز پنج ایزوله علی‌رغم داشتن مقاومت‌به سفوکسیتین در روش دیسک دیفیوژن فاقد ژن *mecA* در روش PCR بودند، دو سویه نیز در روش دیسک دیفیوژن نسبت‌به دیسک سفوکسیتین حساس ولی در روش PCR دارای ژن *mecA* مشاهده شدند. در مطالعه Gomarian و همکاران بر روی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌به متی‌سیلین جدا شده از دو بیمارستان در تهران نشان داد که نتایج تست دیسک دیفیوژن و PCR با هم هم‌خوانی نداشته یعنی ۵۰٪ از سویه‌های مقاوم‌به متی‌سیلین در روش دیسک دیفیوژن و ۷۴٪ از سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند (۵). یافته‌های ما با تحقیق Gomarian در مورد عدم هم‌خوانی نتایج در دو روش دیسک دیفیوژن و PCR مطابقت داشت. مطالعه Yari و همکاران بر روی ۱۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه بالینی پوست بیماران و کارکنان بیمارستان‌های شهر قم نشان داد که در روش دیسک دیفیوژن اگزاسیلین ۳۳ درصد و در روش دیسک سفوکسیتین ۲۸ درصد ایزوله‌ها مقاوم‌به متی‌سیلین بودند (۱۳). نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌های مختلف نشان می‌دهد که روش دیسک اگزاسیلین در مقایسه با دیسک سفوکسیتین دارای مقاومت کاذب به متی‌سیلین در شناسایی سویه‌های MRSA بوده و دیسک سفوکسیتین می‌تواند به‌عنوان روشی ساده، کم هزینه، جانشینی مطلوب برای شناسایی ایزوله‌های مقاوم‌به متی‌سیلین باشد. در نتیجه می‌توان در مراکز فاقد روش مولکولی PCR به‌منظور جلوگیری از گزارش مثبت کاذب از دیسک دیفیوژن سفوکسیتین استفاده کرد (۱۲). ما نیز براساس نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌های قبلی از دیسک سفوکسیتین جهت تست آنتی‌بیوگرام استفاده نمودیم. Dufour و همکارانش در آمریکا برای اولین بار از روش agr typing برای طبقه‌بندی *استافیلوکوکوس اورئوس*ها استفاده کردند و آن‌ها را به چهار گروه طبقه‌بندی نموده و نشان دادند که شایع‌ترین گروه *agr* در مطالعه آن‌ها گروه I است

(۱۴). در تحقیقی دیگر که توسط Indrawattana و همکارانش در تایلند انجام گرفت agr group I، با ۵۸/۷ درصد بیش‌ترین فراوانی را در بین سایر گروه‌ها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از خود نشان داد. در تحقیق ما نیز همانند دو تحقیق قبلی بیان شده *agr*I با فراوانی ۶۰/۷۱٪ در ایزوله‌های MRSA و ۱۵/۵۸٪ در MSSA بالاترین درصد را به خود اختصاص داده است (۱۵). مطالعه Shopsin و همکاران نیز بر روی agr تایپینگ ایزوله‌های جداشده از کودکان و والدین شان نشان داد که agr group I با ۴۲ درصد بیش‌ترین میزان را نسبت‌به سایر تیپ‌ها به خود اختصاص داده است (۱۶). مطالعه Ben Ayed و همکارانش در تونس بر روی ایزوله‌های جدا شده از بیماران صورت گرفت، در نتایج بررسی آن‌ها مشخص شد که ۱۵,۷ درصد ایزوله‌ها متعلق‌به agr group I، ۳/۵ درصد ایزوله‌ها متعلق‌به agr group II، ۴۰/۳ درصد ایزوله‌ها متعلق‌به agr group III هستند (۱۷). در تحقیق ما نیز ایزوله‌های متعلق‌به agr group I و agr group III به‌ترتیب با ۷۶٪ و ۱۱٪ بالاترین میزان را در کل سویه‌های مقاوم و حساس به خود اختصاص دادند. هم‌چنین در مطالعه Chenو همکاران در تایوان بر روی ایزوله‌های جدا شده از بیماران نشان داد که agr group I با ۷۴٪ مشابه بررسی ما دارای بیش‌ترین فراوانی بود (۱۸). Jarraud و همکاران در بررسی خود در آمریکا نشان دادند که سویه‌های مولد سندروم فلسی شدن پوست مرتبط با group IV و ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد سندروم شوک توکسیک متعلق‌به agr group III هستند (۱۹). هم‌چنین Ben Ayed و همکاران در مطالعه خود نشان داد که ایزوله‌های متعلق‌به agr group I عامل عفونت تهاجمی به‌خصوص باکتریمی و ایزوله‌های متعلق‌به agr group III عامل عفونت‌های غیرتهاجمی‌اند (۱۷).

نتیجه‌گیری

تفاوت بین نتایج به-دست آمده از روش فنوتیپی و روش مولکولی PCR ضرورت بازنگری در روش‌های مرسوم تعیین حساسیت ایزوله‌ها نسبت‌به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و به-کارگیری روش دقیق و حساس همانند PCR در شناسایی سویه‌های را نشان می‌دهد. علاوه‌بر این مشخص گردید که در مطالعه حاضر گروه‌های agrI و agrIII نسبت‌به سایر گروه‌ها فراوانی بیش‌تری داشته و گروه agrI. به‌عنوان گروه شایع در اکثر نقاط ایران و سایر کشورها شناخته شده است.

سپاسگزاری

در پایان از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) شهرستان بجنورد که ما را در انجام این مطالعه یاری فرمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Iileka AE, Mukesi M, Engelbrecht F, Moyo SR. Antimicrobial susceptibility patterns of Staphylococcus aureus strains isolated at the Namibia Institute of Pathology from 2012 to 2014. *Open Journal of Medical Microbiology*. 2016;6(03):116.

2. Orhan Z, KAYIŞ A, Esra K, Murat A. Phenotypic and Genotypic Analysis of Gentamicin, Penicillin, Methicillin, Vancomycin, Linezolid and Tetracycline Resistance in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. *Tarim ve Doga Dergisi*. 2018;21(6):957.

3. Nester EW, Roberts CE, Nester MT, O'Dell WD. *Microbiology: A human perspective*. WCB; 2011.

4. Hasannejad Bibalan M, Ghaemi E, Shakeri F, Javid N. The relation between accessory gene regulator (agr) types of S. aureus and some phenotypic criteria. *relation*. 2014;17(87):1-8.

5. Gomarian Z, Shahhosseiny MH, Bayat M, Mahmoudi MA, Nafarieh T, Rahbar M. Prevalence of methicillinresistant staphylococcus aureus isolated from moheb and milad hospitals via phenotypic and molecular methods. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2015; 23(4): 2096-2108.

6. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(11):3581-5.

7. Havaei SA, Azimian A, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Isolation of Asian endemic and livestock associated clones of methicillin resistant Staphylococcus aureus from ocular samples in Northeastern Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2013;**5**(3):227.

8. assanzadeh S, Pourmand MR, Hadadi A, Nourijeylani K, Yousefi M, Mashhadi R, et al. Frequency and antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Tehran. *Journal of Medical Bacteriology*. 2013;2(3-4):41-6.

9. Zamani A, Sadeghian S, Najafi Mosleh M, Goodarzi MT, Yousefi Mashouf R, Ghaderkhani J. Detection of methicillin-resistance gene (mec-A) in Staphylococcus aureus strains by PCR and determination of antibiotic sensitivity. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*. 2007;14(3):54-8.

10. Shokri R, Salouti M, Sorouri Zanjani R, Heidari Z. Frequency of meticillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from clinical samples in Mousavi Hospital, Zanjan, and recognition mec A gene using PCR. J. Microbial World. 2014;7(1): 58-65.

11. Ramoz A, Hosseini M, Saleh P. Frequency of drug resistance in Staphylococcus aureus isolates isolated from Imam Reza and Shohada hospitals of Tabriz during the years 2011-2013. Iranian J. Infect. Dis. Trop. Med. 2016; 21(73): 27-36 .

12. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2013;16(2):29-37.

13. Yari Z, Mahdavi S, Khayati S, Ghorbani R, Isazadeh A. Evaluation of antibiotic resistance patterns in Staphylococcus aureus isolates collected from urinary tract infections in women referred to Shahid Beheshti educational and therapeutic center in Maragheh city, year 2016. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*. 2019;41(6):106-12.

14. Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, et al. High genetic variability of the agr locus in Staphylococcus species. Am Soc Microbiol; 2002.

15. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookrung N, Chongsa-Nguan M, Tungtrongchitr A, Voravuthikunchai S, et al. Staphylococcus aureus clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm. *BioMed Research International*. 2013.

16. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, et al. Prevalence of agr specificity groups among Staphylococcus aureus strains colonizing children and their guardians. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):456-9.

17. Ayed B, Boubaker B-B, Boukadida J, Hammami S, Redjeb B. Hospital acquired outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection initiated by a health care worker. *La Tunisie Medicale*. 2010;88(3):199-202.

18. Chen F-J, Siu L-KK, Lin J-C, Wang C-H, Lu P-L. Molecular typing and characterization of nasal carriage and community-onset infection methicillin-susceptible S taphylococcus aureus isolates in two Taiwan medical centers. *BMC infectious diseases*. 2012;12(1):1-8.

19. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*. 2002;70(2):631-41.