



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 Moghaddam¹, Amir Azimian^{2,*}, Abbas Akhavan Sepahi³,
Alireza Iranbakhsh¹

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 human. The development of resistance to various antibiotics in this bacterium has become a global problem that due to the importance *accessory gene regulator (agr)* in this bacterium, which is responsible for coordinating and controlling the production and secretion of toxins and virulence factors. The purpose of this study was to investigate the pattern of antibiotic resistance and determine specific groups *agr*, in order to find the dominant type of region in sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Materials and methods: Different clinical samples were prepared of Clients to Imam Reza Hospital in Bojnourd and phenotypic tests were performed on *Staphylococcus aureus* strains. 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 chain reaction (PCR) and *agr* groups were determined by multiplex PCR.

Results: In this study, the highest antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* against cefoxitin was (75%). Isolates (73. %) have *mecA* gene and in sensitive and methicillin resistant strains the 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 is different in various regions, it is necessary to determine the strains isolated from each region in order to find the dominant type in that region.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *agr* genes, Methicillin-resistance, *mecA* gene, Iran Science

Corresponding author:

Department of Pathobiology and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, North Khorasan University Medical Sciences, Bojnurd, Iran

Email: amir_azimian2003@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی حضور ژن تنظیم کننده فرعی (*agr*) در ایزوله های

استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین

(*mecA*) جدا شده از نمونه های بالینی بجنورد، شمال شرق ایران

پرستو ضرغامی مقدم^۱، امیر عظیمیان^{۲*}، عباس اخوان سپهی^۳، علیرضا ایرانبخش^۱

۱. گروه زیست شناسی، 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 مهم ترین عوامل بیماری زا در انسان ها محسوب می گردد که بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در این باکتری به معضلی جهانی تبدیل شده که با توجه به اهمیت ژن تنظیم کننده فرعی که مسئول هماهنگی و کنترل تولید و ترشح توکسین ها و فاکتورهای ویروالانس در این باکتری است. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین فراوانی گروه های اختصاصی *agr* به منظور یافتن گروه غالب در منطقه در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و حساس به متی سیلین است.

مواد و روش ها: نمونه های بالینی مختلف از مراجعین به بیمارستان امام رضا (ع) بجنورد تهیه و تست های فنوتیپی برای جداسازی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. جهت تأیید حساسیت دارویی از روش انتشار از دیسک استفاده گردید. با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز سویه های مقاوم به متی سیلین دارای ژن *mecA* شناسایی و تعیین گروه های *agr* توسط Multiplex PCR صورت گرفت.

یافته ها: در این بررسی بیش ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس در برابر سفوکسیتین (۷۵٪) مشاهده شد، ۷۳/۰۵٪ ایزوله ها دارای ژن *mecA* و در سویه های حساس و مقاوم به متی سیلین بیش ترین درصد مربوط به گروه *agrI* با فراوانی ۶۰/۷۱٪ و ۱۵/۵۸٪ بود.

نتیجه گیری: از آنجایی که بیماری زایی سویه های متعلق به گروه های اختصاصی *agr* در مناطق گوناگون متفاوت است، ضروری است که سویه های جدا شده از هر منطقه جهت یافتن تیپ غالب تعیین تیپ گردند.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن های *agr*، مقاومت به متی سیلین، ژن *mecA*، Iau Science.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس^۱ به عنوان یکی از مهم ترین عوامل

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

بیماری زای باکتریایی در انسان ها ده ها سال است منشاء عفونت های برگرفته از جامعه و بیمارستان است که به علت مقاومت روزافزون در برابر داروهای ضدباکتریایی، به یکی از نگرانی های اصلی سلامت عمومی تبدیل شده و به عنوان دومین پاتوژن شایع در عفونت بیمارستانی به یک چالش و معضل درمانی در بیمارستان های سراسر جهان مبدل شده است که روز به روز از تعداد آنتی بیوتیک های مؤثر برای درمان این عفونت ها کاسته می شود. از انواع خطرناک عفونت های استافیلوکوکی باکتری، پنومونی،

¹ *Staphylococcus aureus*

مورد نیاز برای بقا باکتری می شود، می توان با قطع عمل ترانسداکشنال سیگنال ها از بروز این ژن های ویروالانس کاست (۴). لذا با توجه به اهمیت ژن ساختاری *agr*، بررسی فراوانی گروه های مختلف این ژن در شمال شرق ایران به کمک روش Multiplex PCR جهت شناسایی گروه غالب منطقه و مقایسه آنها با تیپ های رایج سایر نقاط ایران و آسیا در سویه های دارای ژن مقاومت و حساس به متی سیلین ضروری است.

مواد و روش ها

نمونه گیری

این پژوهش بر روی نمونه های بالینی (خلط، خون، زخم، آبسه، ادرار، مایع نخاع و مایع مفصل، بافت، کاتتر، پریتون، 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.

تست های فنوتیپی

تست های تأییدی

تأیید ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روش های فنوتیپی استاندارد آزمایشگاهی (رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کواگولاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار DNase، انجام شد. ایزوله ها پس از تأیید توسط آزمایش های ذکر شده برای انجام مراحل بعدی در محیط Skim milk برآت نگهداری گردیدند.

روش دیسک دیفیوژن

در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰.۵ کدورت نیم مک فارلند از نمونه های تأیید شده، آن ها را بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت نموده و سپس دیسک های آنتی بیوتیک (پادتن طب، ایران پادتن طب ایران و MASTDISCS, UK) و نکوماکسین^۴ (۳۰ میکروگرمی)، سفوکسیتین^۵ (۳۰ میکروگرمی)، سیپروفلوکسازین^۶ (۵ میکروگرمی)، تتراسیکلین^۷ (۳۰ میکروگرمی)، کوتریموکسازول^۸ (۱۲،۵ میکروگرمی)،

استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک توکسیک را می توان نام برد. (۲۰۱). تجویز زیاد آنتی بیوتیک ها توسط پزشکان و استفاده ناصحیح توسط بیماران باعث شیوع سویه های مقاوم در جامعه شده است که می توان با درمان مناسب و به موقع از به وجود آمدن سویه های مقاوم و انتشار در جمعیت های انسانی جلوگیری به عمل آورد (۳). مکانیسم اصلی مقاومت به متی سیلین در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با تولید پروتئین جدیدی به نام PBP2a توسط ژن های *mec* موجود در کروموزوم باکتری مرتبط بوده است که این پروتئین میل ترکیبی کمی با بتالاکتام ها داشته و سبب مقاومت به بتالاکتام ها می گردد. در باکتری حساس فاقد این ژن، آنتی بیوتیک متی سیلین با میل ترکیبی بیش تری به PBP2a در دیواره سلول باکتری متصل می شود که سبب لیز دیواره سلول و سرانجام مرگ باکتری می گردد (۲). در میان ژن های مرتبط با ویروالانس باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن تنظیم کننده فرعی (*agr*) سنتز بسیاری از فاکتورهای ویروالانس را در طی رشد باکتری بر عهده داشته و بیان پروتئین های وابسته به دیواره سلولی و خارج سلولی که در اتصال باکتری به میزبان نقش داشته به وسیله این لوکوس کنترل می شود. این سیستم از یک لوکوس وابسته به تراکم سلول باکتری^۲ و هم چنین بخش ترشح پپتید خود القاگر^۳ تشکیل شده که به جمعیت باکتری امکان رسیدن به یک غلظت آستانه یا بحرانی را می دهد. لوکوس *agr* از دو واحد رونویسی مختلف تشکیل شده که توسط پروموتورهای P2 و P3 از هم متمایز می شوند. اپرون P2 مسئول کد کردن چهار پروتئین *agr* (*A-B-C-D*) است. *استافیلوکوکوس اورئوس* را می توان براساس تفاوت در توالی ژن *agrC* که کد کننده گیرنده پپتید خود القاگر و ژن *agrD* که کد کننده پپتید خود القاگر است به چهار گروه *agrI*، *agrII*، *agrIII* و *agrIV* تیپ بندی نمود. بررسی ها نشان داده که هر ایزوله *استافیلوکوک* فقط دارای توالی مربوط به یکی از این گروه ها است. *استافیلوکوک* های مناطق مختلف دارای الگوهای مختلف بوده و این الگو از شهری به شهر دیگر و حتی از بیمارستانی به بیمارستان دیگر متفاوت است. از آنجایی که سیستم *agr* باعث بیان ژن های متنوع متابولیکی، ژن های اسپورولاسیون، ژن های ویروالانس و سایر ژن های

⁴ V: Vancomycin

⁵ FOX: Cefoxitin

⁶ CP: Ciprofloxacin

⁷ TE: Tetracycline

⁸ SXT: Co-trimoxazole

² Quorum sensing

³ Auto inducer peptide

جنتامایسین^۹ (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین^{۱۰} (۲ میکروگرم) و ریفامپین^{۱۱} (۳۰ میکروگرم)، به وسیله پنس استریل بر سطح پلیت قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد مقاومت یا حساسیت براساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. از سویه /استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 به عنوان کنترل مثبت و سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 موجود در بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۵).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^{۱۲}) آنتی-بیوتیک اگزا سیلین به روش آگار دایلوژن
در این تست روش آگار دایلوژن برای انجام MIC استفاده گردید. ابتدا محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) حاوی غلظت های متوالی از اگزا سیلین تهیه و از کشت ۱۸ ساعته باکتری مقدار ۱۰ میکرولیتر (CFU/ml) به صورت نقطه بر روی محیط کشت داده شد و در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت پلیت ها از غلظت کم تر به بیش تر بررسی شده و اولین پلیتی که هیچگونه رشدی از باکتری در آن مشاهده نشود به عنوان MIC گزارش گردید (۶).

تست های ژنوتیپی

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی /استافیلوکوکوس اورئوس های ایزوله شده با استفاده از کیت (QiaAmp DNA Mini) Kit Cat شرکت QIAGEN آلمان انجام شد. کلنی ایزوله ها به محیط کشت LB^{۱۳} 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 به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. سپس پروتئین کیناز K و دیگر محلول های ذکر شده در پروتکل الصافی افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس با افزودن اتانول و سانتریفیوژ 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 مقاوم به متی-سیلین، بررسی تمام ایزوله ها از نظر وجود ژن *mecA* به روش PCR با پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. مخلوط نهایی واکنش شامل ۰/۸ 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 به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله واسرشت به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷°C، مرحله گسترش به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. کنترل مثبت سویه aureus ATCC43300 *Staphylococcus* انتخاب گردید. برای بررسی محصول PCR از روش الکتروفورز به وسیله ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده و بعد از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داک مشاهده شد (۷).

agr تایپینگ

تعیین تیپ های *agr* با روش Multiplex PCR برای تمام نمونه ها 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 میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۲۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها به کار برده شد. سپس این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر به تعداد ۳۰ سیکل قرار داده شد: مرحله واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C، مرحله واسرشت به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، مرحله اتصال به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۵۷°C، مرحله گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و مرحله گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. برای بررسی محصول PCR از روش الکتروفورز به وسیله ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ حدود ۱۱۰ ولت به-

^۹ GM: Gentamicin

^{۱۰} CC: Clindamycin

^{۱۱} RA: Rifampin

^{۱۲} Minimum inhibitory concentration

^{۱۳} Luriabroth

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

نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک و MIC

در بین ۳۰۸ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ابتدا در برابر آنتی بیوتیک 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 سویه ها (۹۸/۷٪) در برابر این آنتی بیوتیک حساس مشاهده شدند. در بررسی آماری مشخص شد که ارتباط معناداری بین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده وجود دارد ($p < 0.05$). نتایج تعیین میزان MIC متی سیلین نیز نشان داد که فقط دو نمونه ($MIC=4$) میکروگرم بر میلی لیتر داشته و ۲۳۰ نمونه دیگر مقاومت کامل به متی سیلین را از خود نشان دادند.

واکنش PCR جهت تشخیص ژن *mecA*

بررسی حضور ژن *mecA* بر روی تمامی نمونه های /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

ایزوله های /استافیلوکوکوس اورئوس

مقایسه نتایج به دست آمده نشان داد که در روش های فنوتیپی دیسک دیفیوژن و MIC از بین ۳۰۸ ایزوله جداسازی شده /استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۳۲ ایزوله نسبت به دیسک سفوکسیتین مقاومت نشان دادند و MIC تمامی آن ها ≥ 4 ثبت گردید ولی در مطالعه ژنوتیپی ایزوله ها در روش PCR تعداد ۲۲۵ ایزوله دارای ژن *mecA* بودند. نتایج حاصل از روش های ژنوتیپی و فنوتیپی مورد استفاده در این تحقیق، ۷ سویه با هم اختلاف داشتند که پنج ایزوله علی رغم مقاومت به سفوکسیتین در روش فنوتیپی فاقد ژن *mecA* در روش PCR بوده و دو سویه دیگر نیز در روش دیسک دیفیوژن و MIC نسبت به سفوکسیتین حساس ولی دارای ژن

mecA بودند (جدول ۳). 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 سویه های مقاوم و حساس به متی سیلین وجود ندارد ($p > 0.05$).

نتایج PCR برای تعیین گروه های *agr*^{۱۴} در ایزوله های MRSA و MSSA

نتایج فراوانی گروه های *agr* در نمودار ۲ قابل مشاهده است که بیشترین فراوانی در گروه *agrI* در ایزوله های MRSA (۶۰/۷۱٪) و MSSA (۱۵/۵۸٪) ثبت گردید که با بالاترین مقدار (۱۹/۴۸٪) در نمونه های زخم مشاهده شد و بعد از آن متعلق به گروه *agr III* در MRSA (۷/۷۹٪) در MSSA (۳/۸۹٪) ثبت گردید. آنالیز آماری بین گروه های *agr* شناسایی شده در بین نمونه های حساس و مقاوم نشان داد که اختلاف معناداری بین این پنج گروه در ایزوله های MRSA و MSSA وجود دارد ($p < 0.05$).

بحث

باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس با ایجاد بیماری های متنوع در انسان ها موجب تهدید سلامتی آن ها به همراه مشکلات اقتصادی جدی شده که شناسایی ژن های مرتبط با ویروانس این باکتری از جمله ژن تنظیم کننده *agr* که سنتز بسیاری از فاکتورهای ویروانس و تنظیم بیان پروتئین های وابسته به دیواره سلولی را در طی رشد باکتری بر عهده دارد ضروری به نظر می رسد. هم چنین تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری بیماری زای شایع جهت هدایت درمان های تجربی و اختصاصی آن حائز اهمیت است که در ادامه به بررسی چندین مطالعه پرداخته می شود: Hassanzadeh در تهران با استفاده از روش دیسک دیفیوژن از بین ۱۲۰ ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های خون، سواب زخم، ادرار و خلط، ۶۰ مورد MRSA جداسازی نمودند که در این مطالعه بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و اریترومایسین گزارش شد (۸). در این بررسی کار بر روی تعداد نمونه های /استافیلوکوکوس اورئوس بیش تر در بازه زمانی پنج ساله صورت گرفت که با روش دیسک دیفیوژن، ۲۳۲ مورد MRSA شناسایی و بیشترین

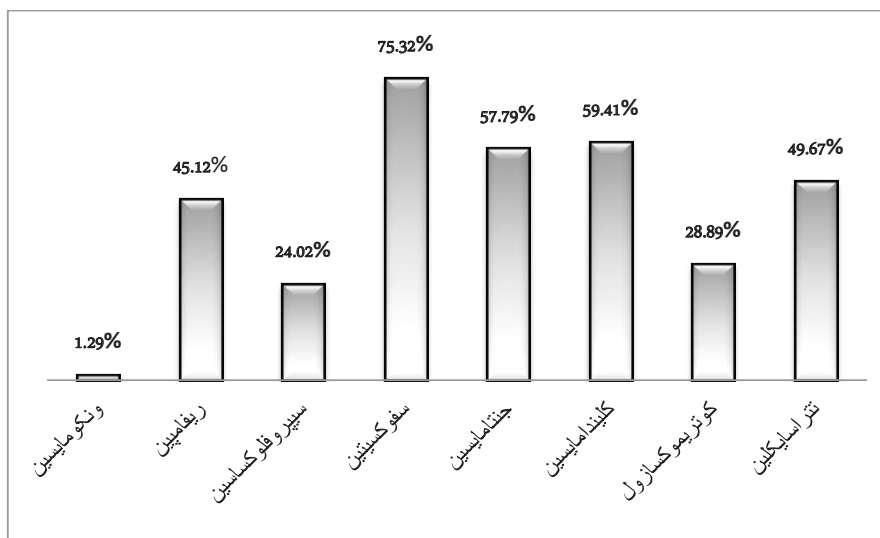
¹⁴ Accessory gene regulator

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

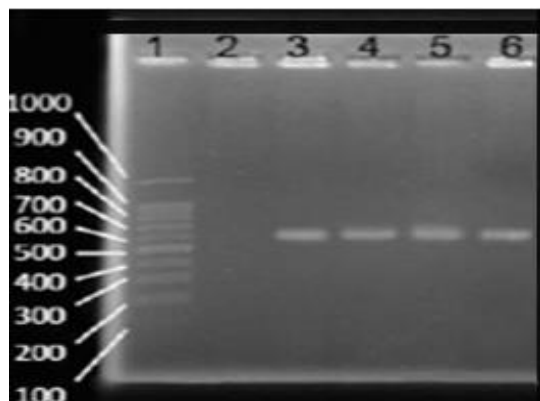
اندازه	مشخصات پرایمر	ژن
583bp	<i>mecA</i> F 5'-AGAAGATGGTATGTGGAAGTTAG-3'	<i>mecA</i>
	<i>mecA</i> R 5'-ATGTATGTGCGATTGTATTGC-3'	

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

اندازه	مشخصات پرایمر	نام پرایمر
-	5'- ATGCACATGGTGCACATGC-3'	forward pan <i>agr</i>
۴۳۹ bp	5'- GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT-3'	reverse <i>agrI</i>
۵۷۲ bp	5'- GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC-3'	reverse <i>agrII</i>
۴۰۶ bp	5'- CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC-3'	reverse <i>agrIII</i>
۶۵۷ bp	5'- CGATAATGCCGTAATACCCG-3'	reverse <i>agrIV</i>



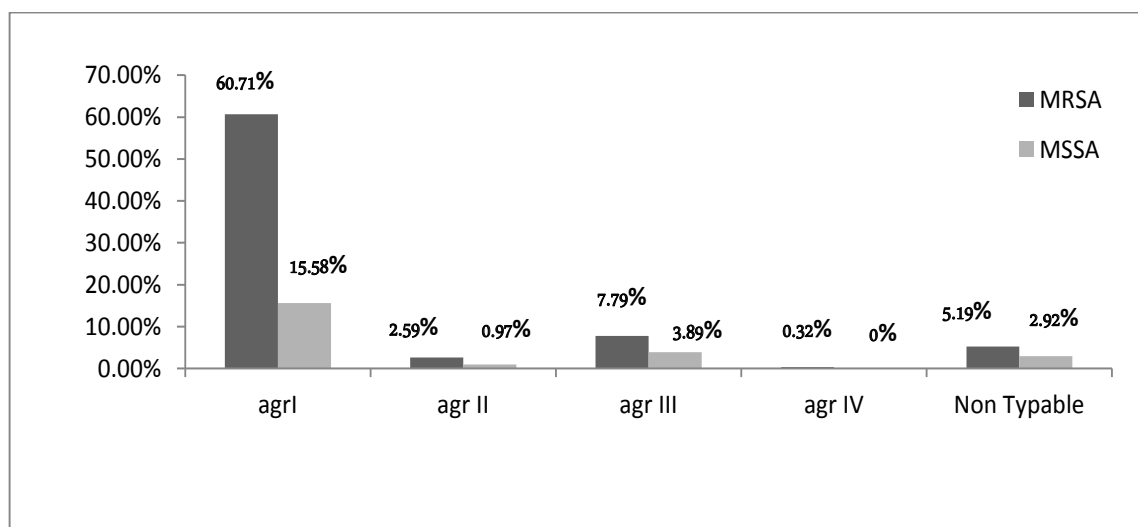
نمودار ۱. مقایسه مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک



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 ۱۰۰ bp، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ کنترل مثبت و سایر چاهک‌ها نمونه‌های دارای ژن *mecA* قابل مشاهده است.

جدول ۳. مقایسه نتایج روش دیسک دیفیوژن، MIC و PCR در سویه‌های MRSA و MSSA

حساسیت	دیسک دیفیوژن	MIC	PCR(<i>mecA</i>)	P value
MRSA	(/۷۵)	(/۷۵)	(/۷۳)	۰/۰۷۵
MSSA	(/۲۴)	(/۲۴)	(/۲۶)	۰/۰۷۵



نمودار ۲. درصد فراوانی گروه‌های اختصاصی *agr* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین

مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین، کلیندامایسین و جنتامایسین ثبت شد. در مطالعه Zamani و همکاران، درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در میان ایزوله‌های MRSA، به ترتیب پنی‌سیلین ۱۰۰٪، تری‌متوپریم 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 مقاومت به 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 الله موسوی زنجان انجام شده بود نشان داد که سویه‌ها بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰٪) و گلوکزاسیلین (۸۰/۷۶٪) و کم‌ترین میزان را نسبت به ونکومایسین (۷/۶۹٪) داشتند (۱۰). در مطالعه Shokri نیز همانند تحقیق ما کم‌ترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین نسبت داده شد که حاکی از مؤثر بودن این آنتی‌بیوتیک در درمان سویه‌های مقاوم به 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 سفوکسیتین و روش غربالگری با اگزاسیلین با غلظت ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به کار گرفته شد، نتایج به دست آمده از آزمایش آنتی‌بیوگرام آن‌ها نشان دادند که بیش‌ترین میزان حساسیت به کلیندامایسین (۸۶٪) و کم‌ترین میزان حساسیت به سفوکسیتین (۱۸٪) بوده و میزان مقاومت به 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 بر روی 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، به ترتیب ۷۵، ۸۵ و ۸۳ درصد ثبت شد و از میان ۸۵ درصد از سویه‌های مقاوم به دیسک سفوکسیتین، ۳ سویه از آن‌ها فاقد ژن *mecA* بودند که بررسی نتایج آن‌ها حاکی از عملکرد بهتر دیسک سفوکسیتین نسبت به اگزاسیلین در شناسایی سویه-های مقاوم به متی‌سیلین بود (۱۲). در مطالعه ما نیز پنج ایزوله علی‌رغم داشتن مقاومت به سفوکسیتین در روش دیسک دیفیوژن فاقد ژن *mecA* در روش PCR بودند، دو سویه نیز در روش دیسک دیفیوژن نسبت به دیسک سفوکسیتین حساس ولی در روش PCR دارای ژن *mecA* مشاهده شدند. در مطالعه Gomarian و همکاران بر روی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به 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 مقاوم به 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 مقاوم به متی‌سیلین بودند (۱۳). نتایج به دست 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 به عنوان روشی ساده، کم هزینه، جانشینی مطلوب برای شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین باشد. در نتیجه می‌توان در مراکز فاقد روش مولکولی PCR به منظور جلوگیری از گزارش مثبت کاذب از دیسک دیفیوژن سفوکسیتین استفاده کرد (۱۲). ما نیز براساس نتایج به دست 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

در مطالعه حاضر گروه‌های *agrI* و *agrIII* نسبت به 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.

(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 *agrI* با فراوانی ۶۰/۷۱٪ در ایزوله‌های MRSA و ۱۵/۵۸٪ در MSSA بالاترین درصد را به خود اختصاص داده است (۱۵). مطالعه Shopsisin و همکاران نیز بر روی *agr* تایپینگ ایزوله‌های جدا شده از کودکان و والدین شان نشان داد که *agr group I* با ۴۲ درصد بیش‌ترین میزان را نسبت به 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 متعلق به *agr group I*، ۳/۵ درصد ایزوله‌ها متعلق به *agr group II*، ۴۰/۳ درصد ایزوله‌ها متعلق به *agr group III* هستند (۱۷). در تحقیق ما نیز ایزوله‌های متعلق به *agr group I* و *agr group III* به- ترتیب با ۷۶٪ و ۱۱٪ بالاترین میزان را در کل سویه‌های مقاوم و حساس به خود اختصاص دادند. همچنین در مطالعه Chen و 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 ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد سندروم شوک توکسیک متعلق به *agr group III* هستند (۱۹). همچنین Ben Ayed و همکاران در مطالعه خود نشان داد که ایزوله‌های متعلق به *agr group I* عامل عفونت تهاجمی به‌خصوص باکتری می و ایزوله‌های متعلق به *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 نسبت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و به-کارگیری روش دقیق و حساس همانند PCR در شناسایی سویه‌های را نشان می‌دهد. علاوه بر این مشخص گردید که

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*. *Tarım 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 methicillin-resistant *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 methicillin 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, Mougél 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.

