مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۶
صفحه: ۷۹۹-۷۹۰

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No. 10, Jan 2018
Pages: 790-799

شناسایی تولید بتالاکتاماز در استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از پلاک‌های دندانی انسان با روش‌های یدومتری و مولکولی

سحر نوری قراجلر[*1]، پریا اماموردی زاده[2]

چکیده

مقدمه: مقاومت نسبت به پنی‌سیلین در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بسیار گسترده می‌باشد. یکی از مهم ترین سازوکارهای بروز مقاومت نسبت به پنی‌سیلین در *استافیلوکوکوس ارئوس* تولید بتالاکتاماز می‌باشد. شناسایی تولید بتالاکتاماز توسط روش‌های مختلفی مانند روش‌های انتشار دیسک، یدومتری، اسیدومتری و مولکولی امکان‌پذیر می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی تولید بتالاکتاماز توسط استافیلوکوکوس ارئوس‌های جدا شده از پلاک‌های دندانی انسان توسط روش‌های مختلف یدومتری و مولکولی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی چهل نمونه پلاک دندانی انسانی با استفاده از فورسپس استریل جمع‌آوری شد. شناسایی و جداسازی *استافیلوکوکوس ارئوس* در نمونه‌های مزبور توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و تکنیک مولکولی PCR صورت گرفت. سپس الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوک‌های* مورد مطالعه با روش کربی بوئر تعیین شد. همچنین تولید بتالاکتاماز توسط باکتری‌های مورد مطالعه توسط آزمون‌های یدومتری و مولکولی عرض‌یابی گشت. نتایج بدست آمده توسط آزمون آماری آنوا و نرم‌افزار SPSS15 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: (۱۲)۳۰٪ از نمونه‌های مورد مطالعه حاوی *استافیلوکوکوس ارئوس* بودند. تمامی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* تولید بتالاکتاماز را توسط روش یدومتری با استفاده از فیلتر کاغذی داشتند. همچنین کلیه سویه‌ها حاوی ژن *blaZ* بودند که توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرازشناسایی قرار گرفت. نتایج آزمون سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش کربی بوئر نیز حاکی از مقاومت ۱۰۰٪ سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش‌های مولکولی (PCR) و یدومتری (روش فیلتر کاغذی) توانایی تشخیص دقیق تر *استافیلوکوکوس ارئوس‌های* مقاوم به پنی‌سیلین را دارا می باشند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس ارئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز، یدومتری، واکنش رنجیره‌ای پلیمراز.

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
۲- بخش پاتولوژی دهان و فک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۴۱۴۶۸۶۳۵، پست الکترونیکی: saharnouri@hahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۰

مقدمه

محوطه دهانی محیط مناسبی برای رشد و کلونیزاسیون گستره وسیعی از باکتری‌ها می‌باشد. پلاک یا بیوفیلم دندانی اشاره به مجموعه ای متنوع از میکروب‌ها (اغلب باکتری‌ها) دارد که بر روی سطح دندان‌ها یافت می‌شوند. اگر پلاک دندانی به طور کامل برداشته نشود پوسیدگی دندان به وقوع خواهد پیوست (۱). پوسیدگی دندانی ناشی از تخریب ساختارهای دندانی توسط اسید تولید شده از سوخت‌وساز کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌های بی‌هوازی موجود در پلاک دندانی می‌باشد (۲). ساکنین اولیه پلاک دندانی از جمله استافیلوکوکوس ارئوس باکتری‌های هوازی می‌باشند که با مصرف اکسیژن و کاهش پتانسیل ردوکس شرایط مساعد را برای رشد باکتری‌های بی‌هوازی فراهم می‌نمایند (۳). فشار انتخابی ناشی از استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌ها در طی ۵۰ سال اخیر منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم و انتشار ژن‌های مقاومت در میان میکروارگانیسم‌های پاتوژن گشته است. باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس با مقاومت‌های آنتی-بیوتیکی چندگانه امروز تبدیل به یک مشکل بهداشتی جدی شده‌اند. بنابراین، دسترسی به متدهای مناسب در شناسایی دقیق مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها، به منظور تشخیص کلینیکی صحیح حائز اهمیت می‌باشد (۴). شناسایی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین منجر به نجات جان عده‌ی کثیری از افراد شده است. اما استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (از جمله پنی‌سیلین) منجر به پیدایش مقاومت در باکتری‌ها گشته است. تولید آنزیم بتالاکتاماز اولین و مهم-ترین منبع بروز مقاومت نسبت به بتالاکتامازها می‌باشد. تولید بتالاکتامازدر استافیلوکوک‌ها توسط ژن‌های بتالاکتاماز هدایت می‌شود. این آنزیم با تجزیه‌ی حلقه‌ی بتالاکتام منجر به غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌گردد (۵). آزمایشات مختلفی در جهت شناسایی تولید بتالاکتاماز در استافیلوکوک‌ها وجود دارد. مانند روش‌های یدومتری مولکولی اسیدومتری متد کروموژنیک و متدهای مختلف ممانعت از پنی‌سیلین که در آن‌ها از تکنیک مستقیم دیسک دیفیوژن و یا از تکنیک‌های غیرمستقیم با استفاده از استافیلوکوک‌های حساس به پنی‌سیلین به عنوان باکتری شاخص استفاده شده است. در این میان روش‌های یدومتری ارزان و سریع بوده و کاربرد بسیار راحتی نیز دارند (۶). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم به پنی‌سیلیناز مانند متی‌سیلین، نافیسیلین، اکساسیلین، کلکساسیلین، دی‌کلکساسیلین و فلوکساسیلین قادر به مقاومت در برابر اثر تجزیه‌کنندگی پنی‌سیلیناز استافیلوکوکی می‌باشند (۷). اگرچه قابلیت تولید بتالاکتامازها توسط متدهای مختلف یدومتری و مولکولی به تنهایی توسط برخی محققین مورد بررسی قرار گرفته است اما مطالعات انجام شده در ضمینه مقایسه آزمون‌های مزبور و تعین میزان حساسیت این روش‌ها محدود می‌باشد. هدف از مطالعه کنونی مقایسه قابلیت آزمون‌های مختلف یدومتری و مولکولی در شناسایی استافیلوکوک‌های مولد بتالاکتاماز می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌ها

در این مطالعه مقطعی، چهل نمونه‌ی پلاک دندانی از مراجعین به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز پس از هماهنگی های لازم و گرفتن رضایت نامه کتبی از افراد، در سال ۱۳۹۴جمع‌آوری شد(کد اخلاق در دانشکده دندان پزشکی دانشگاه تبریز :۵/۳۷۱). حجم نمونه بر اساس مطالعات مشابه انجام گرفته در این زمینه تعیین شد (۱۰،۹،۸). نمونه‌ها بلافاصله در لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین قرار داده شدند و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل گشتند.

جداسازی و شناسایی استافیلوکوکوس ارئوس

کشت و واکنش‌های بیوشیمیایی

کلیه نمونه‌ها پس از هموژن شدن توسط عمل ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه، بر روی محیط آگار خون‌دار و مانیتول سالت آگار(سیگما آلدریچ، آمریکا). کشت شده و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. به منظور شناسایی دقیق‌تر استافیلوکوکوس ارئوس در

نمونه‌ها از روش رنگ‌آمیزی گرم، بررسی الگوی همولیز در محیط آگار خون‌دار و آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز و تست اکسیداسیون- تخمیر استفاده شد (۱۱).

روش مولکولی

کلیه باکتری‌های شناسایی شده توسط روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز مورد تائید تشخیص قرار گرفتند. بدین منظور از کشت شبانه استافیلوکوکوی ارئوس به منظور استخراج ژنوم باکتری استفاده شد. کیت استخراج ژنوم متعلق به شرکت سیناژن ایران در این آزمون مورد استفاده واقع شد. سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه‌ای اختصاصی از ژنوم استافیلوکوکوس ارئوس به طول ۱۰۷ زوج باز با استفاده از پرایمرهای *sau1*: 5′ AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG 3′ و *sau2*: 5′ CGT AAT GAG ATT TCA GTA GTA AAT ACA ACA3′ مورد تکثیر و شناسایی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MWG AC BIOTECH THERMALCYCLER, USA) و با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن (CinnaGen PCR master kit) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۱۰ نانوگرم از DNA نمونه و ۲/۵ پیکومول از هر پرایمر انجام شد که عبارت بود از واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه که توسط ۳۰ چرخه تکثیر با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد. مرحله آخر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه انجام شد (۸). محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برروی آگارز۲/۵٪ (ولتاژ ۷۵، تا زمانی که رنگ بارگذاری تا ۷۵ درصد از طول ژل را طی نماید) مورد عرض‌یابی واقع شدند (۸).

تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی

به منظور تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها از روش کربی بوئر استفاده شد. در این روش سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط مایع مولر هینتون تهیه و به وسیله سوآب سترون بر روی سطح آگار مولر هینتون تلقیح شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی سطح پلیت قرار داده شدند. دیسک‌های مورد استفاده عبارت بودند از: پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم) و سفازولین (۳۰ میکروگرم). قطر مناطق مهار رشد در اطراف دیسک‌ها پس از ۲۴ ساعت قرار دادن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط‌کش میلی‌متری مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

روش‌های یدومتری در شناسایی تولید بتالاکتامازها

روش فیلتر کاغذی

محلول ۱٪ نشاسته در پنی‌سیلین با غلظت ۱۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر تهیه شد. فیلتر کاغذی واتمن شماره ۲ به ابعاد ۱×۵ سانتیمتر بریده شد و در داخل محلول قرار گرفت. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق خشک شد. لوپ کاملی از کشت تازه باکتری بر روی نوار کاغذی تلقیح شد و نوار در داخل پتری دیش قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گشت. سپس محلول یدین بر روی فیلتر ریخته شد. در این تست در صورتی نتیجه تولید بتالاکتاماز مثبت می‌گردد که منطقه‌ی کشت شده در روی نوار در عرض ۵ دقیقه بی‌رنگ شود ولی در صورت بقاء رنگ ارغوانی نتیجه منفی گزارش می‌گردد.

آگار تست

کشت خالصی از استافیلوکوکوس ارئوس برروی محیط آگار مغذی حاوی۰/۲٪ نشاسته تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گشتند. سپس محلول پنی-سیلین برروی پرگنه‌های رشد کرده در پلیت اضافه شد. اضافی محلوی پس از ۱۵ دقیقه خارج گشت. در مرحله بعد محلول یدین با رقت ۱/۵ به روی پرگنه‌ها ریخته شد و پس از نگهداری پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نتیجه قرائت شد. در این متد تولید بتالاکتاماز توسط بیرنگ شدن اطراف پرگنه‌ها مشخص می‌شود.

یدومتری به روش لوله

محلول پنی‌سیلین در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر در لوله‌های کوچکی ریخته شد. لوپ کاملی از کشت شبانه باکتری در محلول پنی‌سیلین تا رسیدن به غلظت10^4 CFU/mL (با استفاده از استاندارد نیمه مک فارلند) حل شد. پس از گذشت ۱ ساعت در دمای اتاق ۲ قطره معرف نشاسته و یک قطره یدین به محلول اضافه شد. واکنش مثبت توسط از بین رفتن سریع رنگ آبی گزارش شد. بقاء رنگ آبی برای بیش از ۱۰ دقیقه حاکی از منفی بودن نتیجه تست داشت (۷).

شناسایی مولکولی ژن‌های بتالاکتاماز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تشخیص حضور ژن *blaZ* در استافیلوکوک‌های مورد مطالعه انجام شد. برنامه بکار رفته در دستگاه ترموسایکلر عبارت بود از: دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴۰ ثانیه که توسط ۳۰ چرخه تکثیر با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه دنبال شد. مرحله آخر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۲۰ ثانیه انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه ۷۰۰ زوج بازی از ژن مربوطه عبات بودنداز:

F: 5′ TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC3′

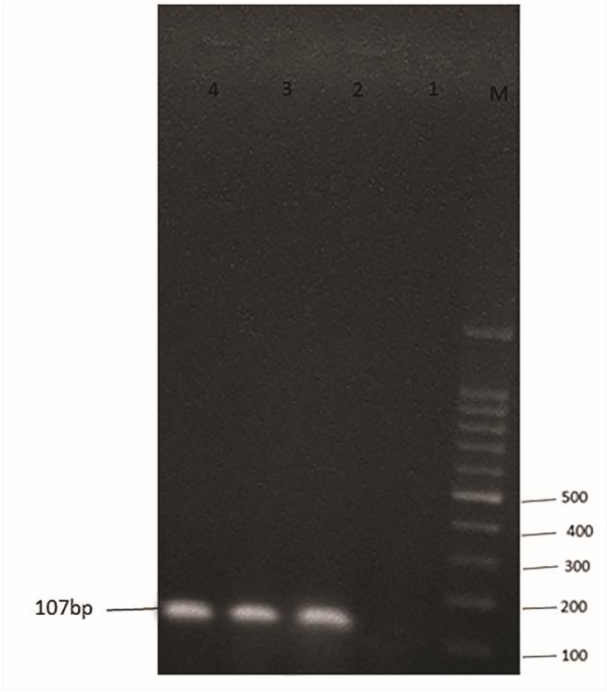
R: 5′ GCC ATT TCA ACA CCT TCT TTC3′

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برروی آگارز۲٪ مورد عرض‌یابی واقع شدند (۱۳).

نتایج بدست آمده توسط آزمون آماری آنوا و نرم‌افزار SPSS15 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از میان ۴۰ نمونه پلاک دندانی اخذ شده ، ۱۲ نمونه بر اساس مورفولوژی کلونی و رنگ آمیزی گرم (کوکسی‌های گرم مثبت) مشکوک به استافیلوکوکوس شدند. کلیه این باکتری‌ها کاتالاز مثبت بودند و برروی محیط آگار خون‌دار پرگنه‌های بتا همولیتیک داشتند. همچنین حاوی پرگنه‌هایی با رنگ زرد بر روی محیط مانیتول سالت آگار بودند. به منظور تائید تشخیص باکتری‌ها از واکنش مولکولی زنجیره پلیمراز استفاده شد. تکثیر



قطعه ۱۰۷ زوج بازی مختص استافیلوکوکوس ارئوس در این تست نشانه صحت تشخیص باکتری‌های جدا شده بود (شکل ۱).

شکل۱- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز حاصل از تکثیر توالی اختصاصی استافیلوکوکوس ارئوس

ستونM- مارکر مولکولی ۱۰۰زوج باز (سیناژن، ایران)

ستون ۱- کنترل منفی

ستون ۲- کنترل مثبت

ستون ۴- ۳- توالی اختصاصی 107bp از *استافیلوکوکوس ارئوس*

نتایج تست سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از این جدول کلیه باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و سفازولین مقاوم بودند.

جدول۱: درصد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در استافیلوکوکوس ارئوس‌های مورد مطالعه

آنتی‌بیوتیک	اریترومایسین	تتراسایکلین	آزیترومایسین	ونکومایسین	جنتامایسین	کلرامفنیکل	سفازولین	پنی‌سیلین
درصد مقاومت	۳۳/۳	۵۰	۳۳/۳	۸۳/۳	۳۳/۳	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰

مقایسه روش‌های مختلف یدومتری در شناسایی تولید بتالاکتامازها

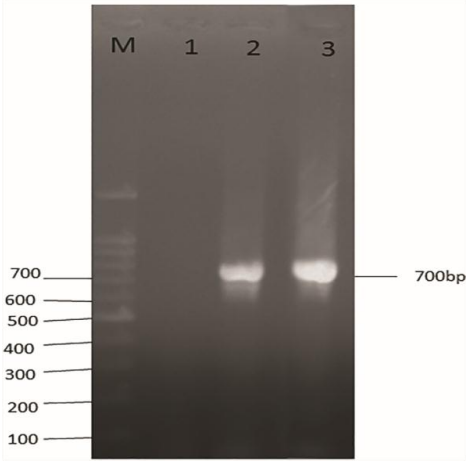
باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده به منظور شناسایی تولید بتالاکتاماز توسط سه متد یدومتری مورد عرض‌یابی واقع شدند. بر این اساس تمامی استافیلوکوک‌های مورد بررسی توانایی تولید بتالاکتاماز را با استفاده از تست فیلتر کاغذی داشتند. ۸۳٪ آنان توسط یدومتری به روش تیوب تست و ۵۸٪ توسط آگار تست مثبت گزارش شدند (جدول ۲).

جدول ۲: استفاده از روش‌های مختلف یدومتری در شناسایی تولید بتالاکتامازها توسط استافیلوکوکوس ارئوس

روش یدومتری	نتایج مثبت درصد تعداد
تیوب تست	۱۰ ۸۳
فیلتر کاغذی	۱۲ ۱۰۰
آگار تست	۷ ۵۸

شناسایی مولکولی تولید بتالاکتاماز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حضور ژن*balZ* را در کلیه ایزوله‌های مورد بررسی تائید کرد. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط تست‌های یدومتری همخوانی داشت (شکل ۲).



شکل۲- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز حاصل از تکثیر ژن ***blaZ***

ستونM- مارکر مولکولی ۱۰۰زوج باز(سیناژن، ایران)

ستون ۱- کنترل منفی

ستون ۲- کنترل مثبت

ستون ۳- ژن (۷۰۰ *blaZ* bp)

بحث

از دهه ۱۹۴۰ تا کنون آنتی‌بیوتیک‌های متعددی در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی استفاده شده است. اما با گذشت زمان استافیلوکوک‌ها نسبت به تمامی آنان توسط مکانیسم‌های مختلفی مقاومت یافته‌اند. تولید بتالاکتامازها مهم‌ترین مکانیسم مقاومت نسبت به پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها در استافیلوکوک می‌باشد. اگرچه تست‌های فنوتیپی مانند دیسک دیفیوژن کربی بوئر، روش‌های یدومتری و یا کروموژنیک متدهای قابل قبولی در شناسایی بتالاکتامازها می‌باشند، ولی موسسه استانداردهای آزمایشگاهی در سال ۲۰۱۱ اعلام نمود که شناسایی ژن *blaZ* باید به جهت تعیین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین صورت گیرد به ویژه در موارد عفونت‌های شدیدی که نیازمند پنی‌سیلین درمانی می‌باشند (۵).

پنی‌سیلین G و V امروزه آنتی بیوتیک‌هایی اند که در درمان عفونت‌های دندانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما عفونت‌های ایجاد شده توسط استافیلوکوک‌های تولیدکننده پنی سیلیناز، توسط پنی سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز، مشتقات آمپی سیلین و یا ونکومایسین درمان می‌شوند. اریترومایسین به عنوان دومین گزینه در درمان عفونت‌های دندانی در افراد دارای آلرژی نسبت به پنی‌سیلین مصرف می‌شود. سفالوسپورین‌ها هم با مکانیسمی مشابه مشتقات آمپی‌سیلین در افرادی که نسبت به پنی‌سیلین ازدیاد حساسیت نشان می‌دهند، مصرف می‌گردند. تتراسایکلین‌ها نیز سومین گزینه در درمان عفونت‌های دندانی محسوب می‌شوند. البته اغلب در موارد التهابات لثه کاربرد دارند (۱۴). در این مطالعه ۱۲ سویه استافیلوکوکوس ارئوس از ۴۰ نمونه پلاک

دندانی انسان توسط تکنیک‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جداسازی و شناسایی گشت. سپس به بررسی اثرات آنتی بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان عفونت‌های دندانی بر استافیلوکوک‌های جدا شده از پلاک‌های دندانی توسط روش دیسک دیفیوژن کربی بوئر پرداخته شد و تولید بتالاکتاماز در آن‌ها توسط روش‌های مولکولی و یدومتری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل شده نشان داد که تمامی استافیلوکوک‌های جدا شده از پلاک‌های دندانی نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند و ۸۳/۳٪ این باکتری‌ها نسبت به ونکومایسین نیز مقاومت نشان دادند. مقاومت به اریترومایسین تنها در ۳۳/۳٪ استافیلوکوک‌های مورد مطالعه دیده شد ولی ۵۰٪ ٪ این باکتری‌ها نسبت به تتراسایکلین مقاوم بودند. بنابراین استافیلوکوک‌های جدا شده از پلاک‌های دندانی نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان عفونت‌های دندانی مقاومت قابل توجهی را نشان دادند که از این میان کمترین میزان مقاومت متعلق به اریترومایسین(۳۳/۳٪) و سایر آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده (کلرامفنیکل۳۳/۳٪، جنتامایسین ۳۳/۳٪ و آزیترومایسین ۳۳/۳٪) بود.

در مطالعه‌ای که Fayaz و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام دادند شیوع و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های موجود در پلاک‌های دندانی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ایشان از میان ۴۰ نمونه اخذ شده استافیلوکوکوس ارئوس رایج‌ترین ارگانیسم جدا شده بود. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مورد مطالعه ایشان نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین و تتراسایکلین که اغلب در درمان عفونت‌های دندانی کاربرد دارند، به اندازه کافی موثر نبودند (۱). در مطالعه حاضر نیز استافیلوکوکوس ارئوس از ۳۰٪ نمونه‌های پلاک دندانی جداسازی و شناسایی شد. همچنین استافیلوکوک‌های جدا شده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده نشان دادند.

همچنین Pournajaf و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ به شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس ارئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنان پرداختند. از میان آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده آنان پنی‌سیلین دارای کمترین فعالیت ضد استافیلوکوکی و ونکومایسین دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی بود (۱۵). در مطالعه کنونی نیز کمترین فعالیت ضد استافیلوکوکی متعلق به پنی‌سیلین و سفازولین بود ولی درصد قابل توجهی از جدایه‌ها نسبت به ونکومایسین هم مقاوم بودند.

روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی در شناسایی تولید بتالاکتامازها در استافیلوکوکوس ارئوس‌های جدا شده از ماستیت گاو توسط Robles و همکاران در سال ۲۰۱۴ مورد استفاده قرار گرفت. مقاومت نسبت به پنی‌سیلین در اغلب سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس مورد آزمایش مشاهده شد. از میان تکنیک‌های مورد استفاده متدهای نیتروسفین و تست Hodge در شناسایی مولدین بتالاکتامازها موفق‌تر بودند (۱۶). Devapria و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ به مقایسه روش‌های مختلف یدومتری در شناسایی استافیلوکوکوس ارئوس‌های مولد بتالاکتاماز پرداختند. از میان سه روش یدومتری مورد استفاده به ترتیب متدهای فیلتر کاغذی، تیوب تست و آگار تست در شناسایی بتالاکتامازها موفق بودند. نتایج به دست آمده از تحقیق کنونی نیز مشابه نتایج Devapria و همکاران می‌باشد. ایشان همچنین به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها پرداختند و نشان دادند که تمامی باکتری‌های مورد بررسی نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند ولی تمامی آنان نسبت به ونکومایسین حساس بودند (۷). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از مقاومت ۱۰۰٪ جدایه‌ها نسبت به پنی‌سیلین می‌باشد ولی از طرف دیگر درصد قابل توجهی از باکتری‌های مورد آزمایش نسبت به ونکومایسین از خود مقاومت نشان دادند. در مطاله انجام شده توسط Kilic وYalinay Cirak در سال ۲۰۰۶ روش‌های مختلف اسیدومتری، یدومتری و کروموژنیک به منظور شناسایی بتالاکتامازها مورد استفاده قرار گرفتند. ایشان نشان دادند که روش‌های یدومتری می‌توانند در مواقعی که متدهای کروموژنیک در دسترس نباشند استفاده شوند و همچنین نشان دادند که روش‌های یدومتری در شناسایی استافیلوکوک‌های مولد بتالاکتاماز موثر می‌باشند (۵). نتایج مطالعات ایشان با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر مطابقت

دارد. همچنین در مطالعه انجام شده توسط Jagad و Vakanee در سال ۲۰۱۷، تولید بتالاکتاماز در باکتری استافیلوکوک توسط روش‌های اسیدومتری، یدومتری و کروموژنیک مورد بررسی قرار گرفت. ۷۴/۶٪ باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند و ۱۱۰ جدایه (۷۳/۳٪) توانایی تولید بتالاکتاماز را توسط روش یدومتری داشتند (۱۷). در مطالعه کنونی تمامی (۱۰۰٪) استافیلوکوک‌های مورد بررسی نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند. در روش یدومتری با استفاده از تست فیلتر کاغذی تمامی استافیلوکوک‌های مورد بررسی توانایی تولید بتالاکتاماز را داشتند.

شناسایی مولکولی ژن بتالاکتاماز در استافیلوکوک‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط Asfour و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد. نتایج آزمایشات ایشان نشان داد که ۶۸ درصد از مولدین بتالاکتاماز حاوی ژن مذکور بودند (۱۸). همچنین Feghaly و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ به شناسایی مقاومت نسبت به پنی‌سیلین در استافیلوکوکوس ارئوس‌های جدا شده از بیماران بیمارستانی پرداختند. نتایج تحقیقات آنان نشان داد که روش‌های مولکولی قابل اعتمادتر از روش‌های فنوتیپی در شناسایی بتالاکتامازها می‌باشند (۱۹). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که روش مولکولی قادر به شناسایی موثر مولدین بتالاکتاماز می‌باشد.

Fawzy و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی ژن‌های مسئول مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس ارئوس‌های جدا شده از نمونه‌های شیر و گوشت پرداختند. از میان ۱۲۵ نمونه مورد بررسی، ۱۹ ایزوله از استافیلوکوکوس ارئوس جدا شد که از میان آن‌ها ۱۴ مورد نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند. بررسی استافیلوکوکوس ارئوس‌های مقاوم به پنی‌سیلین توسط تکنیک مولکولی PCR نشان داد که تمامی آن‌ها واجد ژن *blaZ* بودند (۲۰). در این مطالعه نیز کلیه استافیلوکوکوس ارئوس‌های مقاوم به پنی‌سیلین حاوی ژن مزبور بودند.

نتایج این تحقیق نشان داد که از میان سه متد یدومتری مورد مقایسه، روش فیلتر کاغذی در شناسایی بتالاکتامازها موثرتر از دو روش دیگر می‌باشد. همچنین روش یدومتری در لوله نسبت به آگار تست کارایی بیشتری در شناسایی بتالاکتامازها داشت. همچنین شناسایی مولکولی ژن بتالاکتاماز در کلیه‌ی ایزوله‌ها با نتایج تست یدومتری همخوانی داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند که از کلینیک دندان پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز که در جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری نمودند تشکر نمایند. لازم به ذکر است که این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تبریز انجام شده و حاصل پایان نامه و یا طرح تحقیقاتی نمی باشد.

References:

1- Fayaz M, Sivakumaar PK, Melvin Joe M. ***Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of dental biofilm forming bacteria.*** IJCMAS 2014; 3(5): 46-50.

2- Hale FA. ***Dental caries in dog.*** Can Vet J 2009; 50(12): 1301-04.

3- Zambori C, Tirziu E, Nichita I, Cumpanasoiu C, Valentin Gros R, Seres M, et al. ***Biofilm implication in oral diseases of dogs and cats.*** J Anim Sci Biotechnol 2012; 45(2): 208-12.

4- Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. ***Multiplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and detection of Methicillin and Mupirocin resistance.*** JCM 2001; 39(11): 4037-41.

5- Kilic M, Yalinary Cirak E. ***Comparison of Staphylococcal Beta-Lactamase detection methods.*** FABAD J. Pharm. Sci 2006; 31: 79-84.

6- SNG EH, Yeo KL, Rajan VS, Lim AL. ***Comparison of methods for the detection of penicillinase- producing Neisseria gonorrhoeae.*** Br J Vener Dis 1980; 56: 311-13.

7- Devapria F, Ramesh R, Sajit Khan AK, Shanmugan J. ***B-lactamase production of Staphylococcus aureus: a comparison study of different iodometric methods.***GMJ 2013; 2(1): 16-21.

8- Strommenger B, Kettlitz CH, Werner G, Witte W. ***Multiplex PCR assay for Simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus.*** JCM 2003; 41(9), 4089-94.

9- Daniyan SY, abalaka ME**.** ***Prevalence and susceptibility pattern of bacterial isolates of dental caries in a secondary health care institution, Nigeria.*** Shiraz E-Med J 2011; 12(3): 135-39.

10- Franco E Franko TC, Amoroso P, Marin JM, De Avila FA. ***Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction.*** Braz Dent J 2007; 18(4): 329-33.

11- Rahman B, Ownagh A, Mardani K, Farrokhi Ardebili F. ***Prevalence and molecular characterization of Staphylococci isolated from sheep with subclinical mastitis in West- Azerbaijan province, Iran.*** VRF 2016; 7(2): 155-62. [Persion]

12- Adwan G, Adwan K, Jarrar N, Amleh A. ***Molecular detection of nine antibiotic resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates.*** RAMI 2014; 73(1-2): 9-18.

13- Kang MH, Char MJ, Yoon JW, Kim SG, Lee SY, Yoo JH, et al. ***Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic Staphylococcus pseudintermedius isolates from dogs.*** J. Vet. Sci 2014; 15(3): 409-15.

14- Montgomery EH, Kroeger DC. ***Use of antibiotics in dental practice.*** Dent Clin Notrh Am 1984; 28(3): 433-53.

15- 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; 4(1): 293-97.

16- Robles BF, Nobrega DB, Guimaraes FF, Wanderley GG, Langoni H**.** ***Beta- Lactamase detection in Staphylococcus aureus and coagulase – negative Staphylococcus isolated from bovine mastitis.*** Pesq. Vet. Bras 2014; 34(4): 325-28.

17- Vakanee A, Jagad BP. ***Comparison of three different methods to detect the production of β- lactamase enzyme by Staphylococci.*** IJBAR 2017; 8(1): 1-3.

18- Asfour HAE, Darwish SF. ***Phenotypic and Genotypic detection of both mecA and blaZ genes mediated B-lactam resistance in Staphylococcus strains isolated from bovine mastitis.*** Glob Vet 2011; 6(1): 39-50.

19- Feghaly REE, Stam JE, Fritz SA, Burnham CAD. ***Presence of the blaZ beta- Lactamase gene in isolates of Staphylococcus aureus that appear penicillin susceptibility by conventional phenotypic methods.*** Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 74(4): 388-93.

20- El Seedy FR, Samy AA, Salam HS, Khairy EA, Koraney AA. ***Polymerase chain reaction detection of genes responsible for multiple antibiotic resistance Staphylococcus aureus isolated from food of animal origin in Egypt.*** Veterinary World2017;10(10): 1205-11.

Detection of betalactamase production among *Staphylococcus aureus* isolated from human dental plaques using iodometric and molecular methods

Sahar Nouri Gharajalar*[1], Paria Emamverdizade[2]

[1] Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Dentistry Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 22 Aug 2017 **Accepted:** 12 Oct 2017

Abstract

Introduction: Resistance to penicillin among Staphylococcus aureus species is very widespread. One of the most important resistance mechanisms toward penicillin in *S. aureus* is blaZ production. Detection of beta lactamase production is possible using different methods like disk diffusion, iodometric, acidometric and molecular (PCR) methods. The aim of this study was to detection of beta lactamase production among S. aureus isolated from human dental plaque using iodometric and molecular methods. Descriptive statistics were done using ANOVA test and the statistical package, SPSS, Version 15.0.

Methods: In this cross sectional study, 40 samples of human dental plaques was collected through forceps. Identification and isolation of *S. aureus* from samples was carried out using cultural methods, biochemical and molecular tests. Then, antibiotic resistance patterns of studied *Staphylococci* were determined using Kirby-Bauer method. Also, betalactamase production among the bacteria was evaluated using different iodometric and molecular methods.

Results: 30% (12) of studied samples contained *Staphylococcus aureus*. All *Staphylococcus aureus* strains had beta lactamase production ability using filter paper iodometric method. Also, all spesies had *blaZ* gene, which detected by polymerase chain reaction test. The results of

Conclusions: The result of this study showed that molecular (PCR) and iodometric (filter paper) methods were more accurate in detection of penicillin resistant *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Beta lactamase, Iodometric, PCR

This paper should be cited as:
Nouri Gharajalar S, Emamverdizade P. **Detection of betalactamase production among *Staphylococcus aureus* isolated from human dental plaques using iodometric and molecular methods.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2018; 25(10): 790-9.

***Corresponding author: Tel: 09141468635, email: saharnouri@hahoo.com**