Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The Relationship Between Vitamin K2 Concentration and Expression of *mecA* and *blaZ* Genes in Clinical Isolates of Multi Drug Resistant of Methicilin Resistance *Staphylococcus aureus*

Naime Kashefi Pasandideh[1], Reza Habibipour[1], Hamed Tahmasebi[2], Mohammad Reza Arabestani[3]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran
2. Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3. Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/11/15
Accepted: 2018/02/12
Available online: 2018/05/14

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 2018; 12(1): 06-15

Corresponding author:

Mohammad Reza Arabestani
Assocaite professor, Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Tel: 081-23838077
Email:
mohammad.arabestani@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: As one of the fat-soluble vitamins, vitamin K, can in some cases have intrinsic inhibitory effects on the activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The aim of this study, was to determine the effect of vitamin K2 on the expression of *mecA* and *blaZ* genes in Multi Drug Resistant Methicilin Resistance *S. aureus* isolates.

Materials and Methods: 76 clinical isolates of methicillin-resistant *S.aureus* were isolated by phenotypic tests. For treatment of isolates, concentrations of 1, 10, 50, 100, 200, 300 and 500 µg / ml of vitamin K2 and different time intervals were used. The q-PCR method was used to quantitatively evaluate the genes. It was also used to analyze the results of REST 2008 V3 and SPSS 16 software.

Results: The expression of *blaZ* and *mecA* genes was reduced only at a concentration of 500 µg / ml of vitamin K2. Additionally, the 48 and 72 hours incubation times had the best effect on the effect of vitamins on the genes studied. In the isolates from clinical specimens, ulcers and urine reduced the expression of *mecA* and *blaZ* genes. Also, there was a significant relationship between incubation time and clinical specimen type on decreasing the expression of the desired genes ($P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$).

Conclusions: In accordance to the results of this study, the use of vitamin K2 can play an important role in the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Gene Expression, Vitamin K2

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Kashefi Pasandideh N, Habibipour R, Tahmasebi H, Arabestani M R. The Relationship Between Vitamin K2 Concentration and Expression of *mecA* and *blaZ* Genes in Clinical Isolates of Multi Drug Resistant of Methicilin Resistance *Staphylococcus aureus* . Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (1): 06-15

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۱ – فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی رابطهٔ غلظت ویتامین K2 و میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاوم به متی‌سیلین

نعیمه کاشفی پسندیده[۱]، رضا حبیبی‌پور[۱]، حامد طهماسبی[۲]، محمدرضا عربستانی[۳]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۲. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۳. مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM1397;12(1): 06-15

نویسنده مسئول:

محمدرضا عربستانی

دانشیار، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۷

پست الکترونیک:

mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین K2 به‌عنوان یکی از ویتامین‌های محلول در چربی، می‌تواند در برخی موارد آثار مهاری مناسبی بر فعالیت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین داشته باشد. هدف از این مطالعه تعیین غلظت ویتامین K2 بر میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین است.

مواد و روش‌کار: ۷۶ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) با تست‌های فنوتیپی از نمونه های بالینی مختلف (خون، ادرار، زخم و غیره) جداسازی شد. برای تیمار ایزوله‌های MRSA، از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین K2 و بازه‌های مختلف زمانی، استفاده شد. عملکرد ویتامین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، بررسی شد. برای سنجش کمّی ژن‌ها از روش Real-time PCR استفاده شد. همچنین به‌منظور آنالیز نتایج به‌دست آمده از نرم افزار REST 2008 V3 و SPSS V16 استفاده شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن‌های *blaZ* و *mecA* فقط در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از ویتامین K2 کاهش داشت. علاوه بر این، زمان‌های گرمخانه‌گذاری ۴۸ و ۷۲ ساعت بهترین اثر عملکردی را از نظر تاثیر ویتامین بر ژن‌های مطالعه شده داشتند. در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی زخم و ادرار، کاهش بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* بیشترین مقدار را داشت. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین زمان گرمخانه‌گذاری و نوع نمونهٔ بالینی و میزان کاهش بیان ژن‌های مد نظر، مشاهده شد ($P\leq$ ۰/۰۱ ، $P\leq$ ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: ویتامین K2 می‌تواند نقش مهمی در کنترل سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین داشته باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، بیان ژن، ویتامین K2، *mecA*، *blaZ*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

ساختار پروتئینی دخیل در دیوارهٔ سلولی میکرواورگانیسم‌ها، به عنوان یکی از مهمترین عوامل محافظتی آنها به‌شمار می‌رود. باکتری‌ها از جمله میکرواورگانیسم‌هایی هستند که در ساختار بیرونی آنها پروتئین و پلی ساکارید به میزان فراوانی یافت می‌شود (۱). از این رو، برخی از ویتامین‌های محلول در چربی که می‌توانند از سطوح آبگریز خارجی باکتری‌ها عبور کنند، در برخی موارد آثار ضدمیکروبی دارند (۲). ویتامین‌های محلول در چربی از مهمترین عواملی هستند که از اسیدهای چرب منشا گرفته‌اند. این ویتامین ها که شامل A، D، E و K هستند که با استفاده از ساختار حلالّیت در چربی خود می‌توانند در غشای باکتری‌ها نفوذ و بر برخی عوامل بیماری‌زا و مقاومتی اثر مهاری بگذارند (۳). ویتامین K (با انواع K1، K2 ، K3 و منادیون سدیم) ترکیباتی دارد که می توانند بر برخی از باکتری‌ها از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین اثر مهاری داشته باشد (۴).

متی‌سیلین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی است که با اتصال به Penicillin binding proteins (PBPs) سبب مهار ترانس پپتیدازها، ممانعت ازساخت پپتیدوگلیکان باکتری و به‌دنبال آن تخریب دیوارهٔ سلولی می‌شود و در نهایت مرگ باکتری را در پی دارد (۵). مقاومت به متی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی در اثر فعالیت ژن‌های *mecA* و *blaZ* است که با کدکردن پروتئین های خاصی، علاوه بر اینکه سبب شکسته‌شدن حلقه‌های ساختاری آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی می‌شوند، عملکرد پروتئین‌های متصل شونده به پروتئین را تغییر می‌دهد. حضور و فعالیت PBPs، یکی از عواملی است که زمینهٔ مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و گسترش سویه‌های مقاوم را فراهم می‌کند (۶). این احتمال می‌رود که سویه‌های MDR استافیلوکوکوس که علاوه بر پنی‌سیلین و متی‌سیلین به برخی سفالوسپورین‌ها هم مقاوم شده‌اند، المنت‌های ژنی را با کاست ژنی *SCCmec* منتقل کنند که علاوه بر ایجاد مقاومت، می‌تواند ژن‌های عامل توکسین را نیز بین سویه‌های حساس منتقل کند. به این ترتیب وقتی سویه‌های حساس، ژن‌های مقاومت را دریافت می کنند، زمینه برای دریافت ژن‌های تولید توکسین هم آماده می‌شود و در کنار مقاومت آنتی‌بیوتیکی، زمینه‌ساز بروز بیماری‌های پوستی شدیدی هم می‌شوند (۷-۹). فعالیت ژن *mecA* و به‌دنبال آن تغییر در ساختار پروتئینPBP به عنوان یکی از راه‌های مقاوم سازی باکتری، متصل نشدنِ آنتی‌بیوتیک و در نتیجه مقاومت باکتری را در پی دارد. از طرفی، ژن blaZ نیز ساختار بتالاکتامی دارو را هدف قرار می‌دهد و شرایط مقاوم‌شدن باکتری به پنی‌سیلین را رقم می‌زند. تفاوت فعالیت این دو ژن به این صورت است که وجود ژن‌های blaZ و یا mecA به‌تنهایی نمی‌توانند سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف را سبب شوند. در بررسی‌های انجام گرفته روی *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهاری ویتامین K2 بر این باکتری نشان داده شده است. از نتایج این مطالعات برمی‌آید که ساختار لیپوزولوب (liposoluble) ویتامین K2 و شباهت ساختاری آن با غشای سیتوپلاسمی *استافیلوکوکوس‌اورئوس*، می‌تواند سبب مهار فعالیت این باکتری شود (۱۰). ویتامین K2 زیر شاخهٔ جانبی به اسم مناکوئینون (Menaquinone) دارد که به احتمال بسیار قوی آثار مهاری خود را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از راه این زیرشاخهٔ اصلی اعمال می‌کند (۱۱).

اثر عملکردی ویتامین‌های محلول در چربی بر روند اثربخشی بهتر آنتی‌بیوتیک‌ها به خوبی مشخص نیست اما در کل، این عوامل بیشتر لایه‌های آبگریز باکتری را هدف قرار می‌دهند و می‌توانند نفوذ برخی آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر دیوارهٔ سلولی باکتری مثل بتالاکتام‌ها و سفالوسپورین‌ها را با سهولت بیشتری همراه کنند. پس، پروتئین‌های آبگریز اثر اصلی خود را بر کانال های انتقالی و پمپ‌های افلاکسی باکتری‌ها می‌گذارند و می‌توانند در ابتدا باکتری را نسبت به دارو نفوذپذیرتر کنند، سپس با کاهش فعالیت پمپ‌های افلاکسی مانع از خروج دارو از فضای داخلی باکتری شوند که در نهایت منجر به مرگ اورگانیسم با دوزهای کمتر می‌شود (۵،۱۲).

این در حالی است که، همچنان عملکرد دقیق ویتامین K2 بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، کامل شناخته نشده است. از این رو با استفاده از روش‌های کمی ـ مولکولی می توان به اثر ویتامین K2 بر میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* پرداخت که در بروز مقاومت به متی‌سیلین و بتالاکتام‌ها در *استافیلوکوکوس اورئوس*، نقش دارند. استفاده از real-time PCR می‌تواند در کنار سرعت و دقت، مقادیر اثر پذیری ژن‌های مطالعه شده را هم نشان دهد (۱۵ـ۱۳). پس، هدف از این مطالعه تعیین اثر مهاری ویتامین K2 بر بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین است تا بتوان با آن الگوی دقیقی از اثر این ویتامین بر ژن‌های دخیل در مقاومت‌های بتالاکتامی ارائه کرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، کشت و شناسایی ایزولهٔ استافیلوکوکوس اورئوس

دراین مطالعهٔ مداخله‌ای، با در نظر گرفتن یک دورهٔ ۹ ماهه، نمونه‌گیری برای جمع‌آوری سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از بازهٔ زمانی تیر ۱۳۹۵ تا فروردین ۱۳۹۶ انجام شد. معیار ورود، بیمارانی بودند که به‌مدت بیش از ۲هفته در بیمارستان بستری و مشکوک به عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شده بودند. معیار خروج نیز بیماران سرپایی و سایر بیماران دچار شده به عفونت‌های غیر استافیلوکوکوسی بودند. نمونه‌های مختلف بالینی از بیماران بستری در بخش‌های مختلف مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان جمع‌آوری شد. روش نمونه‌گیری به شیوهٔ آسان و در دسترس و تصادفی لحاظ شد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی چهارگانه شامل کاتالاز،

کواگولاز، DNA آز و تخمیر، مانیتول گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شدند. در نهایت برای تفریق سویه‌های جمع‌آوری شده از میکروکوک‌ها از تست اکسیداز استفاده شد (۱۶).

غربالگری سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با مقاومت چندگانه

ابتدا الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جمع‌آوری شده به واسطهٔ استفاده از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم (شرکت و کشور سازنده) و روش انتشار از دیسک تعیین شد و سویه‌های با قطر هالهٔ کمتر از ۲۱میلی‌متر به عنوان *استافیلوکوکوس‌اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد. سپس، سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از کلاس‌های گوناگون براساس روش انتشار دیسک مشخص شد. به منظور تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اریترومایسین ۱۵ میکروگرم، پنی‌سیلین ۱۰ واحدی، سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرمی، تتراسایکلین ۳۰ میکروگرمی، آمیکاسین ۳۰ میکروگرمی، سفازولین ۳۰ میکروگرمی، جنتامایسین ۱۰ میکروگرمی، نورفلوکساسین ۱۰میکروگرمی و سیپروفلوکساسین ۱۵ میکروگرمی (Mast، انگلستان) استفاده شد. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ATCC25923 کنترل منفی *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت ۱۵ ایزولهٔ بالینی که مقاومت چندگانه داشتند، برای انجام کارهای مداخله‌ای استفاده شدند (۱۷).

آماده‌سازی رقت‌های ویتامین K2 و سنتز cDNA

غلظت‌های ویتامین K2 (Sigma-aldrich، آمریکا)، بر مبنای روش استاندارد Clinical & Laboratory Standards (CLSI) Institute برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، تهیه شد (۱۷). بدین صورت که غلظت‌های هفت‌گانه به‌صورت ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. برای این کار، پودر ویتامین K2 بعد از رقیق‌سازی با محلول DMSO براساس میزان غلظت و خلوص درج شده روی ویال پودر ویتامین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق‌سازی شد. بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری (انکوباتور شیکردار) برای سنجیدن میزان و مقدار اثر ویتامین K2 در نظر گرفته شد.

استخراج Total RNA با استفاده از کیت REboExGeneAll)،کره) و سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت Transcriptas (GeneAll، کره) انجام شد. در نهایت برای کیفیت و کمیت سنجی cDNA به‌دست آمده به ترتیب از ژل آگارز ۲/۵ درصد و ضریب جذب نوری (با استفاده از نانودراپ در جذب ۲۶۰ بر ۲۸۰ نانومتر) استفاده شد. محصولات سنتز شده برای آزمایش نهایی در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۸).

آزمون Real–time PCR

در این پژوهش با استفاده از تکنیک real-time PCR و با دستگاه Step One Plus (ABI، آمریکا) مقادیر بیان ژن محاسبه شد. میکس نهایی در حجم ۲۰ میکرولیتر که شامل ۴ میکرولیتر مسترمیکس، از هر پرایمر۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار) و ۱ میکرولیتر از cDNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم) شده استفاده شد. حجم باقی‌مانده با استفاده از محلول (DEPC) Diethyl pyrocarbonate جبران شد. چرخهٔ دمایی به‌صورت ۱۰ دقیقه واسرشت اولیه و ۳۰ ثانیه ذوب ثانویه برای هر یک ۹۵ درجهٔ سلسیوس، ۹۰ ثانیه اتصال در دمای ۵۹ درجهٔ سیلسیوس با ۴۰ سیکل انجام شد. برای بررسی Efficiency و شرایط حاکم بر واکنش، نمودار استاندارد رسم شد. برای این کار رقت‌های مختلف از محصول PCR حاصل را تهیه کرده، سپس برای آنها تست PCR time-Real انجام و از CTهای حاصل و غلظت موجود برای ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد، بعد از تهیهٔ نمودار استاندارد به وسیلهٔ فرمول $\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ بازدهی واکنش PCR time-Real ارزیابی شد. محاسبهٔ بیان ژن ها براساس فرمول (-ΔCT) 1+Efficiency و مطالعات Pfaffl method انجام شد. در این بررسی از ژن *gmk* به عنوان ژن محافظت شده (رفرانس) و ژن‌های *mecA* و *blaZ* به‌عنوان ژن هدف استفاده شد. همچنین از سویهٔ استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل استفاده شد (۱۹).

تجزیهٔ و تحلیل آماری

به منظور آنالیز کمّی اطلاعات از نرم افزار REST نسخهٔ ۲۰۰۸ استفاده شد. از نرم افزار SPSS نسخهٔ ۱۶ و آزمون‌های آماریOne Awy ANOVA، Two Way ANOVA و *t*-Student برای آنالیز آماری متغیرهای مختلف استفاده شد ($P\leq$ ۰/۰۱ ، $P\leq$ ۰/۰۵).

جدول۱. پرایمرهای استفاده شده در واکنش Real Time PCR

ژن‌های مطالعه شده	توالی نوکلئوتیدی	طول محصولات	منبع
gmk	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACTACAACGTAATCGTA	۳۱۸	(۲۰)
mecA	AAAGAACCTCTGCTCAACAAGT TGTTATTTAACCCAATCATTGCTGTT	۱۸۴	(۲۰)
blaZ	AAGAGATTTGCCTATGCTTC GCTTGACCACTTTTATCAGC	۵۱۸	(۲۱)

یافته‌ها

نتایج حاصل از جداسازی، کشت و شناسایی ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس

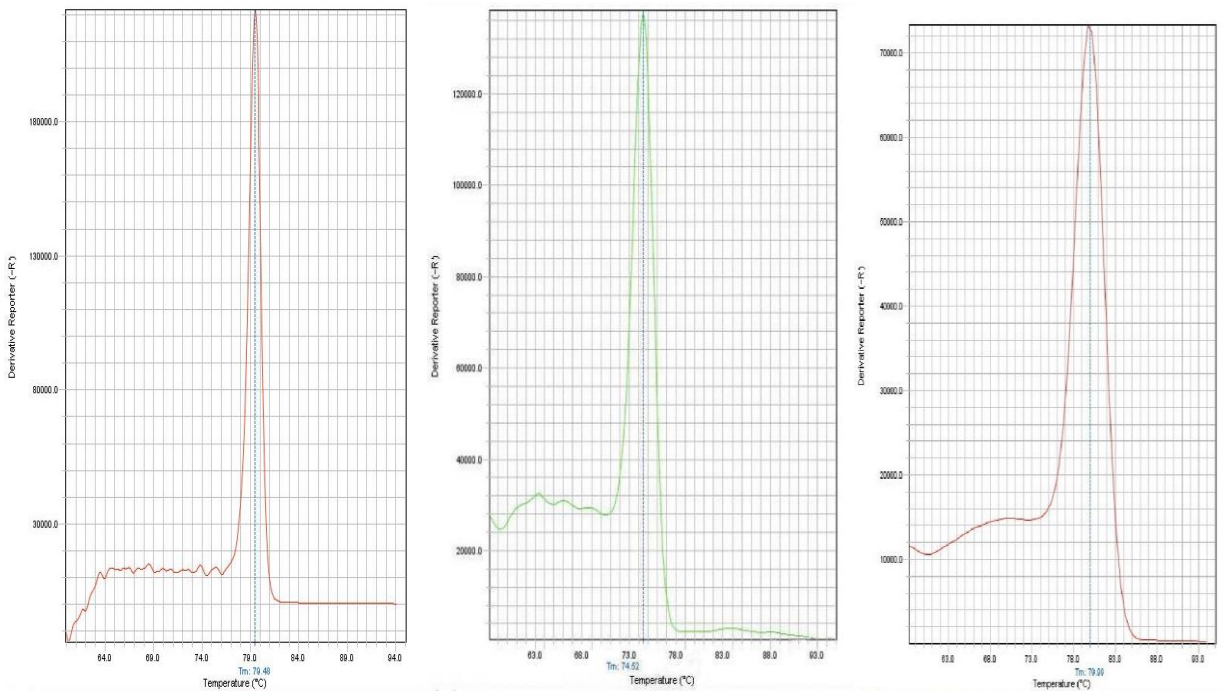
از مجموع ۱۲۹ ایزولهٔ *استافیلوکوکوس‌اورئوس* جمع‌آوری شده، ۷۶ ایزوله (۵۸/۹۱٪)*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند. از این سویه‌های مقاوم، ۱۹ ایزوله (۲۵٪) از زخم، ۱۳ ایزوله (۱۷/۰۱٪) از خون، ۲۳ ایزوله (۳۰/۲۶٪) از ادرار، ۸ ایزوله (۱۰/۵۲٪) از تراشه، ۴ ایزوله (۵/۲٪) از کاتاتر، ۹ ایزوله (۱۱/۸۴٪) از ترشحات از بیماران بستری در بیمارستان جداسازی شد.

نتایج حاصل از غربالگری سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مقاومت چندگانه

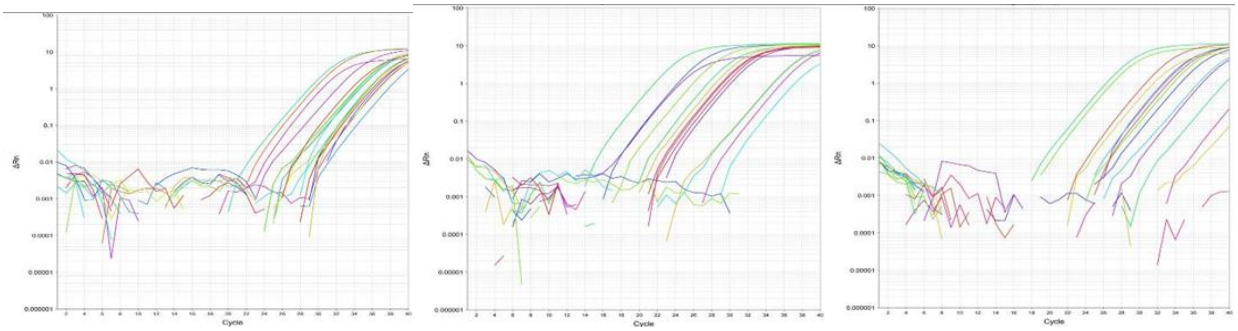
همچنین از میان ۷۶ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سلین، ۲۸ ایزوله (۳۶/۸۴٪) مقاوم به سفتازیدیم، ۴۹ ایزوله (۶۴/۷۱٪) مقاوم به اریترومایسین ۵ میکروگرم، ۷۶ ایزوله (۱۰۰٪) مقاوم به پنی‌سیلین ۱۰ واحدی، ۵۹ ایزوله (۷۷/۶۳٪) مقاوم به نورفلوکساسین ۱۵میکروگرمی، ۱۹ ایزولهٔ (۲۵٪) مقاوم به گاتی فلوکساسین ۱۵ میکروگرمی و ۴۷ ایزولهٔ (۶۱/۷۴٪) مقاوم به اوفلوکساسین ۵ میکروگرمی بودند. در این بین ۱۵ ایزوله با مقاومت کامل فنوتیپی نسبت به همهٔ آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده بودند که از آنها برای تست‌های مولکولی استفاده می‌شد. هیچ یک از این سویه‌ها هالهٔ عدم رشد تشکیل نداده بودند.

نتایج حاصل از آزمون Real–time PCR

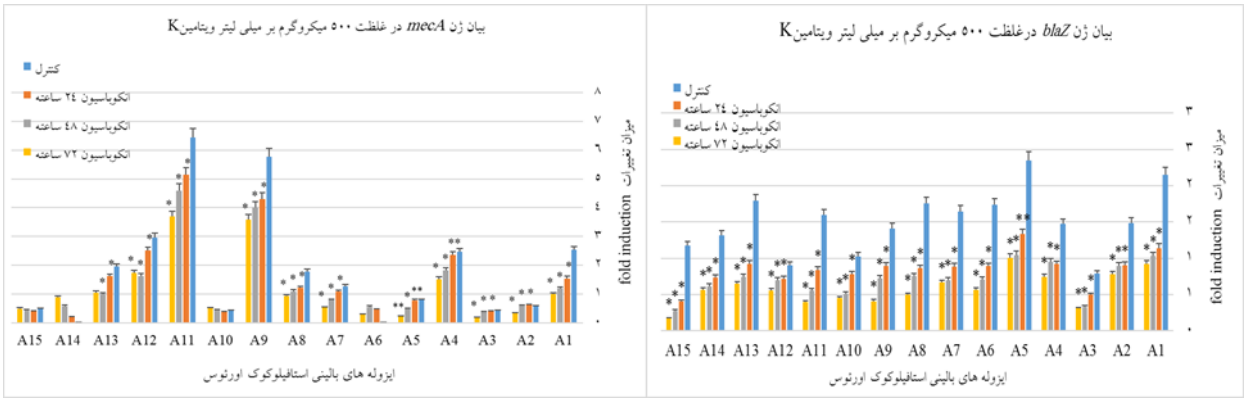
ابتدا برای به‌دست آوردن اختصاصیت پرایمرهای مطالعه شده از روش تعیین دمای ذوب استفاده شد (نمودار۱). از ژن *gmk* به‌عنوان ژن محافظت شده (رفرانس) برای تجزیه و تجلیل نتایج استفاده شد. با در نظر گرفتن میانگین CT به‌دست آمده از این ژن برای ایزوله‌های مدنظر، بهترین میانگین، ۲۷ به‌دست آمد و مقادیر بیان ژن‌های مطالعه، بر مبنای آن محاسبه شدند. برای به‌دست آوردن این عدد، ایزوله‌های تیمار شده و تیمار نشده، در دو مرحله آزمون شدند تا خطاهای احتمالی پوشش داده شود. سپس با استفاده از نمودارهای آمپلیکاسیون، میزان تکثیر ژن‌های بررسی شده، تعیین شد (نمودار۲). کاهش بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در غلظت‌های پایین ویتامین K2 مشاهده نشد. در حالیکه در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این ویتامین، مقادیر ژن‌های بررسی شده به میزان معنی‌داری کاهش یافتند. این در حالی بود که، زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، بهترین اثر را در کاهش بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* داشتند. کاهش فعالیت ژن‌های مطالعه شده فقط در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از نمونه‌های ادرار و زخم مشاهده شد (نمودار۳).



نمودار۱. تعیین اختصاصیت پرایمر ژن‌های *gmk* (سمت راست)، *mecA* و *blaZ* (سمت چپ) با استفاده از دمای ذوب cDNA



نمودار۲. منحنی حاصل از تکثیر موفقیت آمیز ژن‌های *gmk* (سمت راست)، *mecA* و *blaZ* (سمت چپ) در ایزوله‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین. مقدار ترشولدر برای تمام مراحل ۰/۰۰۲ در نظر گرفته شده است.



نمودار۳. میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با ویتامین K در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر.

نتایج براساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل ارائه شده است. *$P\leq$ ۰/۰۵ و **$P\leq$ ۰/۰۱ معنی‌دار است. ستون‌های فاقد* $P>$ ۰/۰۱ بی معنی است.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌های آماریOne Awy ANOVA، Two Way ANOVA و *t*-Student برای آنالیز آماری متغیرهای مختلف استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون‌های آماریOne Awy ANOVA، و *t*-Student مشخص کرد که ارتباط معنی‌داری بین زمان انکوباسیون و مقدار بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* وجود دارد. این در حالی بود که با استفاده از آزمون Two Way ANOVA، غلظت‌های اولیه که به صورت ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده بود، فاقد ارتباط معنی‌داری بودند ولی غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم ارتباط معنی‌داری بین متغیرهای ذکر شده داشتند. همچنین در ژن *blaZ* که به میزان بیشتری تحت اثر قرار گرفته بود، در مقایسه با ایزوله های تیمار نشده، در غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم بیشترین معنی‌دار بودن ارتباط بین زمان، مقدار گرمخانه‌گذاری و غلظت ویتامین مورد استفاده مشاهده شد. در تمامی ارتباط سنجی‌ها، اثر ویتامین K2 بر میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* ایزوله‌های تیمار شده به عنوانH_0 و اثر نداشتن ویتامین K2 بر میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* ، ایزوله‌های تیمار شده به عنوان H_1 در نظر گرفته شدند. با این فرض که ویتامین K2 می‌تواند در غلظت‌ها و گرمخانه‌گذاری های مختلف بین ایزوله‌های تیمار شده و تیمار نشده متفاوت ظاهر شود و بر مقیاس ژن‌های بررسی شده اثر بگذارد، H1 رد و فرضیه این پژوهش تایید شد. همچنین، براساس آزمون *t*-Student با در نظر گرفتن مستقل بودن نوع نمونهٔ بالینی، ارتباط معنی‌داری بین نوع نمونهٔ بالینی میزان بیان ژن‌های گروه مطالعه، مشاهده شد، به نحوی که کاهش بیان ژن در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های زخم و ادرار بیشتر بود ($P\leq$ ۰/۰۱ ، $P\leq$ ۰/۰۵)(نمودار۳).

بحث

درمان عفونت‌های با منشا *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، از سال ۱۹۵۰ با کشف پنی‌سیلین به‌صورتی جدی و کارآمد آغاز شد اما پس از چندی با شکست مواجه شد. سویه‌های جدیدی ظهور کردند که طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را مهار کرده و در مقابل آنها مقاومت می‌کردند (۲۲). یکی از این سویه‌هایی که تبدیل به خطری جدی شده است، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک است. این سویه‌ها، که بیش از ۱۳۰ زیر سویه در *استافیلوکوکوس اورئوس* از آن شناسایی شده است، می‌تواند در برابر طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مقاومت نسبی تا ۱۰۰ درصدی از خود نشان دهد. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی، سفالوسپورینی، فلوروکوئینولونی و حتی ژیرازی می‌توانند در از بین بردن این باکتری با شکست مواجه شوند (۲۳). می‌توان گفت، از مهم‌ترین دلایل مقاومت‌های گسترده در *استافیلوکوکوس اورئوس* حضور آنزیم‌های مختلف و مسبب مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است. از مهمترین آنزیم‌هایی که این باکتری تولید کرده، بتالاکتاماز است که ژن‌های خاصی آن را کد و کنترل می‌کنند (۱۲). تغییر در میزان بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* در شرایط مختلف از جمله کاهش و افزایش دوز دارو، بافت هدف درگیر شده به‌وسیلهٔ باکتری و مواجه با عوامل محیطی، می‌تواند علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین و متی‌سیلین، باکتری را به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مقاوم کند. از این رو، با مهار این ژن‌ها می‌توان عفونت‌های وابسته به سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها بتالاکتامی را با سرعت بیشتری درمان کرد (۲۴).

مطالعهٔ حاضر که با هدف تاثیردهی ویتامین محلول در چربی بر فعالیت برخی ژن‌های دخیل در مقاومت‌های بتالاکتامی در *استافیلوکوکوس اورئوس* صورت گرفت، نشان داد که ویتامین K اثرات متفاوتی در تغییر بیان ژن‌های *mecA* و *blaZ* داشت. با بررسی‌های صورت گرفته برای اثر ویتامین K در رقت‌های هفت گانه و زمان‌های ۳ گانه ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت مشخص شد که این ویتامین می‌تواند همهٔ ژن‌های در حال مطالعه را تغییر دهد. ایزوله‌های با مقاومت‌های چندگانه، در رقت‌های بالا اثرپذیری چشمگیری داشتند و بهترین عملکرد مهاری ویتامین K2 در رقت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. میزان بیان ژن‌های *blaZ* و *mecA* با توجه به زمان‌های مختلف نیز دستخوش تغییرات چشمگیری شد. به طوری که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، بیشتر عملکرد ویتامین K2 مشاهد شد. در مطالعاتی که Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۴ در چین داشتند، آثار ویتامین K2 بر *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین ارزیابی فنوتیپی شد. در این پژوهش مشخص شد که این ویتامین می‌تواند در محیط آزمایشگاه در کنار برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها آثار مهاری چشمگیری از خود نشان دهد. به طوری که توانست در ترکیب با آنتی‌بیوتیک داپتومایسین، میزان حداقل غلظت مهاری باکتری را به‌شدت دستخوش تغییر قرار دهد. در مطالعات آنها مشاهده شد که ویتامین K2 و برخی زیر واحدهای آن می‌توانند در مهار سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوسِ دارایِ

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی موثر باشند. در مطالعهٔ ما، میزان بیان ژن *mecA* به مراتب کمتر از ژن *blaZ* دستخوش تغییر شد. شاید این امر به دلیل آن باشد که بروز تغییرات در ساختار باکتری تیمار شده با ویتامین K2، مثل کاهش پایداری دیوارهٔ سلولی در کنار افزایش نفوذپذیری کانال‌های انتقالی یا پمپ‌های افلاکسی، شرایطی را فراهم می‌کند که آنتی‌بیوتیک بتواند با قدرت بیشتری نقش خود را ایفا کند. بر این اساس، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین که فعالیت‌های کانالی و افلاکس پمپی آن مختل شده، با دوزهای کمتری به درمان پاسخ می دهد (۴).

در بررسی‌های Andrade و همکاران در سال ۲۰۱۷ در برزیل، مشخص شد که ویتامین K2 و برخی ترکیبات و زیرمجموعه‌های آن می‌توانند در مهار سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای آنزیم بتالاکتاماز، اثرگذار باشند. در این بررسی، نشان داده شد که اثر ویتامین K2 و ترکیبات حاصل از آن، به واسطهٔ کم‌کردن مقاومت اورگانیسم به نفوذ دارو و در نهایت افزایش حساسیت باکتری به دارو است. در حالی است که مطالعهٔ ما بیان‌کنندهٔ کاهش بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به متی‌سیلین و پنی‌سیلین است. این امر به دلیل حضور ترکیباتی مثل Menadione و همچنین 1,4- naphthoquinone است که می توانند در دراز مدت و در غلظت‌های بالا، ساختار باکتری را به سمتی هدایت کنند که بتواند با سرکوب‌کردن یا کاهش‌دادن فعالیت ژنتیکی خود، حساسیت به دارو را در خود افزایش دهد. شاید بتوان یکی از مهم‌ترین دلایل این موضوع و ترکیبات ذکر شده را، همسانی ساختار دیوارهٔ باکتری‌ها، به‌ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* و ویتامین‌های محلول در چربی مثل ویتامین K دانست. این یکنواختی در ساختار، می‌تواند ورود آنتی‌بیوتیک را با سهولت نسبی همراه کند و بتواند باکتری را به مقدار بیشتری در برابر آنتی‌بیوتیک و دوزهای کمتر، حساس کند. از این رو، نتایج به‌دست آمده در این پژوهش و موارد ذکر شده از مطالعه مورد بحث، همخوانی دارند (۱۲).

در مطالعهٔ حاضر، ژن‌های *blaZ* و *mecA* در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی متفاوت، سطح بیان متفاوتی را نشان دادند. به طوری که، ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از نمونه‌های زخم و عفونت ادراری کاهش چشمگیرتری داشتند که شاید بتوان یکی از دلایل آن را، موضعی بودن باکتری‌هایِ مطالعه دانست زیرا در عفونت‌های موضعی بر خلاف عفونت‌های منتشره، کنترل و مهار عفونت راحت‌تر است. در مطالعات صورت گرفته، دربارهٔ اثر ویتامین‌های مختلف بر روند درمان بسیاری از عفونت‌های حیوانی و انسانی بحث شده است. استفاده از برخی ویتامین‌های محلول یا غیرمحلول در چربی علیه برخی عفونت‌های باکتریایی، به ویژه عفونت‌های استافیلوکوکی، می‌تواند نوید بخش مسیر جدیدی در زمینهٔ درمان باشد (۲۵). در مطالعاتی که George و همکاران در هند و Yue و همکاران در دانمارک در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، نشان داده شد که روند استفاده از ویتامین‌های ضروری بدن، می‌تواند عفونت‌های وابسته به *استافیلوکوکوس اورئوس* در انسان و حیوان را کنترل و حتی مهار کند. این امر می‌تواند نوید بخش استفادهٔ گسترده و بهینه از ویتامین‌های ضروری در کنار آنتی‌بیوتیک‌هایی باشد که زمانی باکتری‌ها به آن مقاوم بودند (۲۶، ۲۵). با پی گرفتن این روند، می‌توان امیدوار بود که کاربرد گستردهٔ ویتامین‌ها به ویژه ویتامین K2 و زیرمجموعه‌های آن، بتواند قطعیت کاربرد مکمل‌های غذایی در کنار آنتی‌بیوتیک را به‌منظور به حداقل‌رساندن مقاومت‌های دارویی اثبات کند.

کاهش بیان ژن‌های *blaZ* و *mecA* در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک تیمار شده با ویتامین K2، نشان دهندهٔ آثار مثبت این ویتامین بر برخی ژن‌های دخیل در مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود. این امر می‌تواند بر متداول‌تر کردن استفادهٔ داروهای ضدمیکروبی و ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سلین با مقاومت چندگانه، در کنار ویتامین‌هایی مثل ویتامین K2 ب صحه بگذارد. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که، افزایش حساسیت باکتری‌های تیمار شده به وسیلهٔ ترکیبات ویتامین-آنتی‌بیوتیک به دلیل کاهش بیان برخی ژن‌های پایه‌ای و کنترلگر در مسیرهای مقاومتی است. گرچه نتایج این مطالعه، نمی تواند به صورت کامل بیان‌کنندهٔ این موضوع باشد ولی می‌توان احتمال داد که ترکیبات جدیدی، همراه با ویتامین‌ها، بتوانند مسیر درمان را هموارتر کنند. از این رو، پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات پایه‌ای گسترده‌تر در مقیاس آزمایشگاه و حیوان آزمایشگاهی، مقدمات از بین بردن این احتمال و قطعیت دادن به آن فراهم شود.

سپاسگزاری

مقالهٔ حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Leejae S, Hasap L, Voravuthikunchai SP. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in Staphylococcus aureus by rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. J med microbiol. 2013;62(3):421-8. https://doi.org/10.1099/jmm.0.047316-0 PMid:23242641
2. Matheson EM, Mainous AG, Hueston WJ, Diaz VA, Everett CJ. Vitamin D and methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage. Scand J Infect Dis. 2010;42(7):455-60. https://doi.org/10.3109/00365541003602049 PMid:20210515
3. Khameneh B, Fazly Bazzaz BS, Amani A, Rostami J, Vahdati-Mashhadian N. Combination of anti-tuberculosis drugs with vitamin C or NAC against different Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis strains. Microb Pathog. 2016;93(11):83-7. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.006 PMid:26602814
4. Yuan G, Zhu X, Li P, Zhang Q, Cao J. New activity for old drug: In vitro activities of vitamin K3 and menadione sodium bisulfite against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Afr J Pharm Pharmacol. 2014;8(17):451-54. https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3903
5. Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani SH, Malekianzadeh E. Staphylococcus Aureus Resistance to Vancomycin: A Six Years Survey,(2006-2012). Med J Tabriz Univ Med Sci. 2013;35(3):40-5.
6. Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini M. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta medica Iranica. 2014;52(6):424-9. PMid:25130148
7. Imani Fooladi AA, Ashrafi E, Tazandareh SG, Koosha RZ, Rad HS, Amin M, et al. The distribution of pathogenic and toxigenic genes among MRSA and MSSA clinical isolates. Microb pathog. 2015;81(9):60-6. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.03.013 PMid:25778391
8. Srinivasan A, Bankowski MJ, Seifried SE, Jinno S, Perkins R, Singh S, et al. A probe-based method for confirmation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and detection of Panton–Valentine leukocidin and tst virulence genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(4):541-3. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.005 PMid:21658873 PMCid:PMC4719149
9. Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in meticillin-resistant and meticillin-susceptible Staphylococcus aureus isolates. J med microbiol. 2008;57(9):1106-12. https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002790-0 PMid:18719180
10. Tintino SR, Morais-Tintino CD, Campina FF, Pereira RL, Costa MS, Braga FB, et al. Action of cholecalciferol and alpha-tocopherol on Staphylococcus aureus efflux pumps. EXCLI j. 2016;15:31(5)-22.
11. Witt M, Kvist N, Jorgensen MH, Hulscher JB, Verkade HJ. Prophylactic Dosing of Vitamin K to Prevent Bleeding. Pediatrics. 2016;137(5):1-10 https://doi.org/10.1542/peds.2015-4222 PMid:27244818
12. Andrade JC, Braga FB, Guedes GMM, Tintino SR, Freitas MA, Quintans LJ, et al. Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. Saudi J Biol Sci. 2017;24(1):59-64. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.004 PMid:28053572 PMCid:PMC5198922
13. Pierpaoli E, Cirioni O, Barucca A, Orlando F, Silvestri C, Giacometti A, et al. Vitamin E supplementation in old mice induces antimicrobial activity and improves the efficacy of daptomycin in an animal model of wounds infected with methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 2011;66(9):2184-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkr254 PMid:21676901
14. Wang JW, Hogan PG, Hunstad DA, Fritz SA. Vitamin D sufficiency and Staphylococcus aureus infection in children. Pediatr Infect Dis J. 2015;34(5):544-5. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000667 PMid:25860535 PMCid:PMC4400212
15. Lee KM, Go J, Yoon MY, Park Y, Kim SC, Yong DE, et al. Vitamin B12-mediated restoration of defective anaerobic growth leads to reduced biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun. 2012;80(5):1639-49. https://doi.org/10.1128/IAI.06161-11 PMid:22371376 PMCid:PMC3347431
16. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of responsible resistance to aminoglycosides genes in clinical samples of Staphylococcus aureus. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(3):38-46.
17. CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth informational supplement; 2015.

18. Ares M. Bacterial RNA isolation. Cold Spring Harb Protoc. 2012;20(9):1024-7. https://doi.org/10.1101/pdb.prot071068

19. Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(11):45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

20. Chan W-S, Chan TM, Lai TW, Chan JFW, Lai RWM, Lai CKC, et al. Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR–melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. J Antimicrob Chemother. 2015;70(2):441-7. https://doi.org/10.1093/jac/dku411 PMid:25336164

21. Robles BF, Nóbrega DB, Guimarães FF, Wanderley GG, Langoni H. Beta-lactamase detection in Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus isolated from bovine mastitis. Pesqui Vet Bras. 2014;34(9):325-8. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400004

22. Larsen AR, Petersen A, Holmes M, Kearns A, Hill R, Edwards G, et al. Utility of a newly developed Mueller-Hinton E agar for the detection of MRSA carrying the novel mecA homologue mecC. J Antimicrob Chemother. 2015;70(4):1256-7. PMid:25538168

23. Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of *mecA*- and mecC-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. J Clin Microbiol. 2016;54(1):180-4. https://doi.org/10.1128/JCM.02081-15 PMid:26491186 PMCid:PMC4702756

24. Tahmasebi H, Zeiyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeifar M, Keramat F, et al. The Study of blaZ and mecA Gene Expression in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strains and the Relationship between the Gene Expression Patterns. JIMS. 2017;35(433):1062-7.

25. George L, Bavya MC, Rohan KV, Srivastava R. A therapeutic polyelectrolyte–vitamin C nanoparticulate system in polyvinyl alcohol–alginate hydrogel: An approach to treat skin and soft tissue infections caused by Staphylococcus aureus. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017;160(4):315-24. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.030 PMid:28950196

26. Yue Y, Hymøller L, Jensen SK, Lauridsen C, Purup S. Effects of vitamin D and its metabolites on cell viability and Staphylococcus aureus invasion into bovine mammary epithelial cells. Vet microbiol. 2017;203(5):245-51. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.008 PMid:28619151