

## ارزیابی فراوانی جزایر بیماری زایی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از ژن آلفاتوکسین همراه با تولید پنتون والنن لوکوسیدین در جدایه های عفونت مجاری ادرار

مریم غلامی<sup>۱</sup>، عباسعلی رضائیان<sup>۲\*</sup>

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

### چکیده

**هدف:** استافیلوکوکوس اورئوس دومین عامل رایج ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی است. این باکتری می تواند از طریق انتقال عمودی و افقی ژن های مقاومت زا را جابه جا نماید. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی، فراوانی ژن های *pvl* و *hla* که در جزایر بیماری زایی (SaPIs) قرار گرفته اند و روابط معنی دار بین آنها است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی - توصیفی طی ۳ ماه ۱۰۷ نمونه باکتری های گرم مثبت مشکوک به جنس استافیلوکوک از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری جمع آوری شد. از تست های فنوتیپی و پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* و ژن *coa* با استفاده از روش مولکولی PCR، برای جداسازی جنس و گونه استافیلوکوکوس استفاده گردید. سپس فراوانی ژن های *pvl* و *hla* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. حساسیت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس ها جدا شده به ۱۳ آنتی بیوتیک مختلف از طریق روش دیسک دیفیوژن و بر اساس جداول CLSI مورد بررسی گرفت و در آخر برای سویه های مقاوم به متی سیلین تست MIC گذاشته شد.

**نتایج:** باتوجه به تست های فنوتیپی و ژنوتیپی، ۵۰ جدایه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. نتایج تست آنتی بیوگرام نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰٪) و متی سیلین (۱۰۰٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین (۵٪) و ایمی پنم (۴٪) بوده است. نتایج تست MIC نشان داد که مقدار تأثیرگذار آنتی بیوتیک متی سیلین به بیش از  $8 \mu\text{g}/\text{m l}$  افزایش پیدا کرده است که این مقدار ۴ برابر بیش از حد استاندارد است. مطالعه نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که همه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جزء گروه MDR هستند. هم چنین نتایج PCR نشان داد که ۹۴٪ جدایه ها حامل ژن *hla* و ۲۰٪ نیز حامل ژن *pvl* هستند.

**بحث:** نتایج حاصل از این تحقیق افزایش بیش از حد مقاومت آنتی بیوتیکی را در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مجاری ادراری نشان می دهد. همراهی ژن های موجود در جزایر بیماری زایی هم چون *pvl* و *hla* می تواند بر وخامت موضوع افزوده و درمان عفونت این گونه باکتریایی را با دشواری روبرو نماید.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، جزایر بیماری زایی، *hla*، *pvl*، *coa*

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

پست الکترونیکی: rezaeianfon45@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۹

<sup>1</sup> Panton-Valentine leukocidin

<sup>2</sup>  $\alpha$ -hemolysin or  $\alpha$ -toxin

<sup>3</sup> Staphylococcal pathogenicity islands

## مقدمه

حضور جزایر بیماری‌زای (SaPIs) متحرک ( ۱۷- ۱۵ کیلوباز ) در *استافیلوکوکوس اورئوس* بر شدت بیماری‌زایی آن افزوده است. جزایر بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (SaPIs) دارای یک رابطه نزدیک با فائزهای *استافیلوکوکی* هستند. اغلب آن‌ها ژن‌هایی را برای یک یا تعداد بیش‌تری از سوپراژنتی‌ژن‌ها حمل می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ۳ جزیره بیماری‌زایی ژنومیک ( $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  SA $\nu$ ) است. آلفاتوکسین در جزیره گاما یا  $\gamma$  SA $\nu$  قرار گرفته است. علاوه بر آلفا توکسین، ژن‌هایی مانند توکسین اکسفولیاتیو D و پپتیدهای مودولین قابل حل در فنل که یک توکسین منفذساز است نیز در این جزیره قرار گرفته است (۵،۲۳).

چهار همولیزین آلفا، بتا، دلتا و گاما (توکسین همولیتیک) توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شوند که گلبول‌های خونی را لیز می‌کنند. آلفاتوکسین که یک همولیزین است توسط ژن *hla* کد می‌شود و دراصل یک توکسین منفذساز است. ژن کدکننده آلفاتوکسین (*hla*) با وزن مولکولی ۳۳kD روی کروموزومی و یا پلاسمیدی قرار دارد و از طریق عمودی و افقی قابل انتقال است. این همولیزین قادر است منوسیت‌های انسان، لنفوسیت، گلبول‌های قرمز، پلاکت‌ها و سلول‌های آندوتلیال را لیز کند (۵،۱۲).

طبق نظر سایر محققین، *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های دارای ژن مقاومت به متی‌سیلین که واجد جزیره بیماری‌زایی SCC هستند، اغلب ژن لکوسیدین پنتون والنیتین را نیز دارند. استقرار این دو ژن بر روی ژنوم یک باکتریوفازها لیزوژن  $\phi$ SA2usa قرار داشته که پس از اکتساب افقی، به‌وسیله باکتری بیان می‌شوند. *Pvl* یکی از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی در *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب می‌گردد. این سم شامل دو جزء پروتئینی S (38KDa) و F (32KDa) بوده که به‌وسیله ژن‌های *lukf-pv* و *luks-pv* کنترل و در قالب یک اپرون بیان می‌شوند (۲،۱۳،۲۲).

هدف از این پژوهش بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های آلوده کننده مجاری ادراری، وضعیت مقاومت چندگانه در بین آن‌ها، میزان فراوانی دو ژن *hla* و *Pvl* که نماینده وجود جزایر بیماری‌زایی هستند و نیز احتمال ارتباط معنی‌دار وجود ژن‌های یاد شده با مقاومت آنتی-بیوتیکی است.

*استافیلوکوکوس اورئوس* مهم‌ترین گونه جنس *استافیلوکوک* است که به *استافیلوکوک* طلایی نیز مشهور است. این باکتری کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است. به‌عنوان نرمال فلورای فرصت‌طلب در سطح پوست بدن افراد و به‌خصوص مجاری بینی وجود دارد. به‌دلیل داشتن فاکتورهای بیماری‌زای مختلف می‌تواند در انسان و دام باعث بیماری گردد. این باکتری یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و نیز بیماری‌هایی هم‌چون عفونت‌های پوست و بافت نرم، پنومونی نکروزدهنده، اندوکاردیت، سپتی سمی، استئومیلیت، مسمومیت غذایی (در نتیجه تولید انتروتوکسین) است (۱،۱۷،۲۰،۲۴). حفره‌های بینی مخزن *استافیلوکوکوس اورئوس* در افراد ناقل هستند. بسیاری از اشخاصی که *استافیلوکوک* در بینی شان کلونیزه شده است، ارگانیزم را روی دست‌های خود نیز حمل کرده و موجب انتقال آن به دیگران می‌شوند. انتقال بیمارستانی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر توسط دست کارکنان بیمارستان صورت می‌گیرد. لازم به ذکر است که جنس *استافیلوکوک* شاخص آلودگی هوا نیز است (۲۵).

*استافیلوکوکوس اورئوس* حامل بسیاری از انواع عناصر متحرک ژنتیکی است که از طریق انتقال افقی آن‌ها را به دست آورده است. از جمله آن می‌توان به پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها (Tn)، کاست‌های کروموزومی، توالی‌های الحاقی (IS)، باکتریوفازها و جزایر بیماری‌زایی اشاره کرد (۶). عناصر متحرک ژنتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های بیماری‌زا و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را حمل می‌کنند. امروزه بسیاری از نژادهای *استافیلوکوکوس اورئوس* انسانی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های نظیر پنی‌سیلین و متی‌سیلین مقاوم شده‌اند. مقاومت در *استافیلوکوکوس*‌ها یا با تولید پروتئین‌هایی با میل ترکیبی پائین همانند PBP2a<sup>۱</sup> به‌وسیله ژن *mecA* در گروه MRSA و یا به‌وسیله آنزیم‌های بتا-لاکتامازی که از طریق پلاسمیدها و یا ترانسپوزون‌ها جهت تخریب آنتی‌بیوتیک کسب می‌شوند حاصل می‌گردد. همانند دریافت ژن *VanA* از *انتروکوکوس*‌ها که باعث پیدایش گروه VRSA شده است (۷).

<sup>۱</sup>Penicillin binding protein 2a

## روش کار

آن‌ها آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه با دور -۱۳۰۰ rpm سانتریفیوژ و در ادامه مایع روی رسوب که حاوی DNA باکتری بود جدا گردید و دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۴).

### شناسایی جنس استافیلوکوکبا روش مولکولی PCR:

جهت تأیید جنس استافیلوکوکوس‌هایی که به روش فنوتیپی تشخیص داده شده بودند، از آزمون PCR استفاده شد. به همین منظور از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* (جدول ۱) و طبق برنامه دمایی ارائه شده در (جدول ۲) استفاده گردید (۲). سپس برای تفکیک استافیلوکوکوس اورئوس از سایر استافیلوکوکوس‌ها از پرایمر اختصاصی ژن *coa* (آنزیم کواگولاز) ارائه شده در (جدول ۱) و برنامه دمایی (جدول ۲) استفاده گردید.

**بررسی فراوانی ژن های *hla* و *Pvl*:** پس از غربالگری جدایه-های استافیلوکوکوس اورئوس، جهت تعیین فراوانی و حضور ژن *hla* (آلفا-همولیزین) و ژن *pvl* (پنتون والننتین لوکوسیدین) از پرایمرهای اختصاصی جدول ۱ و برنامه دمایی جدول ۲ استفاده شد.

**نمونه‌گیری:** این مطالعه مقطعی- توصیفی طی اسفند ۹۵ الی اردیبهشت ۹۶ بر روی ۱۰۷ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری به روش نمونه‌گیری تصادفی از مراکز درمانی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر شیراز انجام شد. نمونه‌ها جهت جداسازی اولیه باکتری‌ها بر روی محیط بلاد آگار ساخت شرکت مرک آلمان کشت و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند.

**تشخیص فنوتیپی:** پس از خالص‌سازی باکتری‌های جدا شده، از تست‌های فنوتیپی مخصوص جنس و گونه استافیلوکوکوس اورئوس هم‌چون رنگ‌آمیزی گرم، بررسی کاتالاز، تست OF (جهت جداسازی میکروکوکوس از استافیلوکوکوس)، تست کواگولاز، تست اندونوکلتاز مقاوم به حرارت و کشت روی محیط مانیتول سالت آگار برای شناسایی استفاده شد (۱، ۸، ۱۷، ۲۰، ۲۴).

**تخلیص DNA:** ابتدا در لوله‌های اپندرف ۱/۵ میلی‌لیتری به-طور مجزا، مقدار ۲۰۰ μl آب مقطر استریل ریخته شد و سپس تعداد ۳-۵ کلنی از هر نمونه استافیلوکوکوس به‌طور مجزا به

جدول ۱: توالی‌های پرایمر مورد استفاده

ژن	پرایمر Sequence (5'→3')	طول	سایز (bp)	رفرنس
<i>16S rRNA</i>	Forward: GTAGGTGGCAAGCGTTACC	۱۹	۲۲۹	۱۱
	Reverse: CGCACATCAGCGTCAG	۱۶		
<i>Coa</i>	Forward: ACCACAAGTACTGAATCAACG	۲۲	۸۲۱	۷
	Reverse: TGCTTTCGATTGTTTCGATGC	۲۰		
<i>hla</i>	Forward: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	۲۷	۷۴۴	۱۴
	Reverse: CTTCCAGCCTACTTTTTATCAGT	۲۵		
<i>pvl</i>	Forward: GGAAACATTTATTCTGGCTATAC	۲۳	۵۰۲	۱۶
	Reverse: CTGGATTGAAGTTACCTCTGG	۲۱		

جدول ۲: برنامه دمایی جهت آزمون PCR ژن‌ها مورد مطالعه

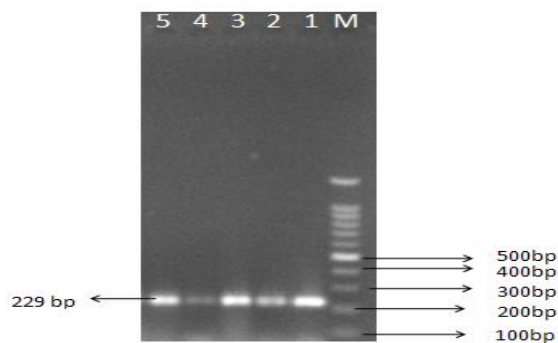
Gene	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	Cycle
<i>16S rRNA</i>	۹۴°C ۴ min	۹۴°C ۳۰ sec	۸۰°C ۳۰ sec	۷۲°C ۱ min	۷۲°C ۵ min	۳۰
<i>Coa</i>	۹۴°C ۴ min	۹۴°C ۳۰ sec	۸۰°C ۳۰ sec	۷۲°C ۱ min	۷۲°C ۵ min	۳۰

<i>hla</i>	۹۴°C ۷ min	۹۴°C ۱ min	۵۸°C ۱ min	۷۲°C ۱ min	۷۲°C ۵ min	۴۰
<i>pvl</i>	۹۴°C ۵ min	۹۴°C ۴۰sec	۶۰°C ۴۰sec	۷۲°C ۱ min	۷۲°C ۵ min	۴۰

T Test و هم‌چنین آزمون آماری k مربع در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ استفاده گردید.

### یافته‌ها:

نتایج تست‌های فنوتیپی نشان داد که از ۱۰۷ نمونه جمع‌آوری شده ۹۲ جدایه مربوط به جنس *استافیلوکوکوس* بوده است. این نتیجه‌گیری با توجه به آزمون مولکولی PCR و استفاده از ژن *16S rRNA* نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن *16S rRNA* روی ژل آگارز ۱٪.

(M: مارکر، ۴-۱: نمونه‌های مثبت، ۵: کنترل مثبت)

نتایج غربالگری جنس *استافیلوکوکوس* نشان داد که از ۹۲ جدایه تأیید شده به‌عنوان جنس *استافیلوکوکوس* با توجه به استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *coa* تعداد ۵۰ جدایه مربوط به گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. لازم به‌ذکر است که تست‌های مانیتول سالت آگار، کواگولاز و اندونوکلناز مقاوم به حرارت برای تمام این ۵۰ جدایه مثبت بوده است (شکل ۲).

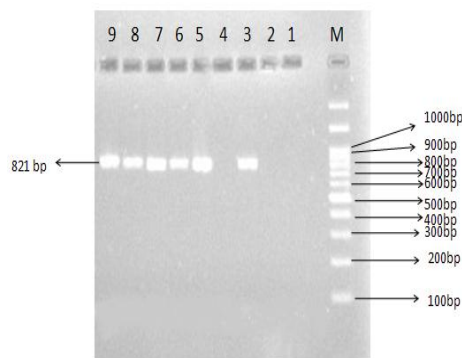
واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سیناژن ایران، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها به غلظت ۱۰ پیکومول (شرکت پیشگام تهران، ایران) و ۲ میکرولیتر DNA لگو (با غلظت ۷۰ ng/μl و خلوص ۱/۸ خوانده شده با دستگاه نانودراپ) انجام شد. محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱٪ و با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. اندازه باندهای به‌دست آمده با استفاده از مارکر ۱۰۰bp در دستگاه ژل داکيومنتیشن مدل Gel Doc XR+ ساخت کشور آمریکا مورد بررسی قرار گرفت. از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC۲۵۹۲۳ به‌عنوان کنترل مثبت و *اشریشیاکلی* ATCC۲۵۹۲۲ به‌عنوان کنترل منفی در تشخیص ایزوله‌ها استفاده گردید (۲۲، ۲۵).

**آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** برای *استافیلوکوکوس اورئوس* های جدا شده با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰ units)، متی‌سیلین (۵ μg)، سفازولین (۳۰ μg)، سفتریاکسون (۳۰ μg)، ایمپنم (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، آزیترومایسین (۱۵ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg)، تتراسیکلین (۳۰ μg)، کلیندامایسین (۲ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg) و هم‌چنین وانکومایسین (۳۰ μg) محصول شرکت پادتن طب ایران و طبق استاندارد CLSI، تست آنتی‌بیوگرام به روش کربی-بائر (دیسک دیفیوژن) گذاشته شد (۱۶، ۲۱).

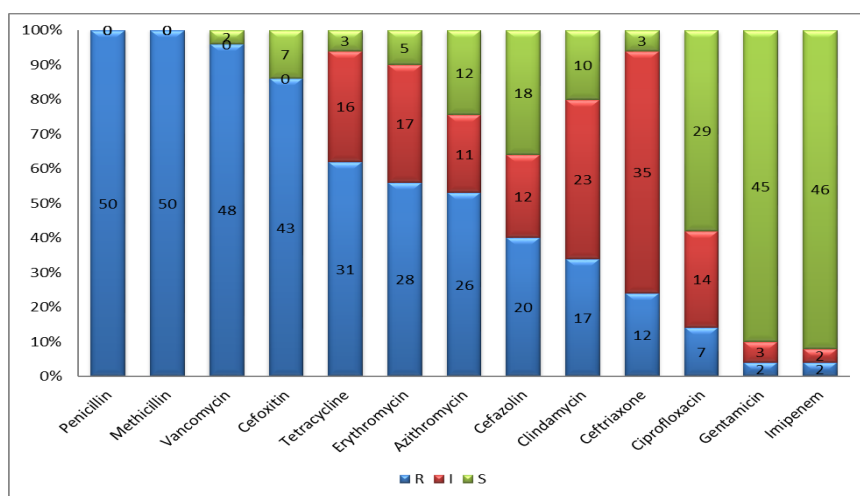
**آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC):** طبق دستورالعمل CLSL برای سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین و اکساسیلین از آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین و بر مبنای رقت‌سازی تست MIC گذاشته شد (۱۶).

**آنالیز آماری داده‌ها:** برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ver20 و هم‌چنین با استفاده از آزمون One Sample

نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین مقاومت را نسبت به پنی‌سیلین و متی‌سیلین و کم‌ترین مقاومت را به ای‌می‌پنم دارند. جواب‌های به‌دست آمده در نمودار ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۲: نتیجه انجام PCR برای شناسایی ژن *coa* روی ژل آگارز ۱٪ (M): مارکر، ۸، ۵، ۳: نمونه‌های مثبت، ۱، ۲، ۴: نمونه‌های منفی و ۹: کنترل مثبت



نمودار ۱: فراوانی درصد مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی در بین *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده  
R = آبی مقاوم، I = قرمز نیمه حساس و S = سبز حساس

پنی‌سیلین و تتراسیکلین و کم‌ترین میزان مقاومت به مربوط کلاس آمینوگلیکوزید و کارباپنم بوده است. هم‌چنین نتایج تست MIC برای آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین نشان داد (جدول ۴) که حداقل غلظت بازدارندگی به بیش از  $8 \mu\text{g/ml}$  افزایش پیدا کرده است.

براساس آزمون One Sample T Test در سطح معنی‌دار  $0.05$  جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه نسبت به پنی‌سیلین، متی‌سیلین، وانکومایسین، سفوناکسیم، تتراسیکلین، اریترومایسین و آزیترومایسین مقاومت معنی‌داری را در سطح  $p \leq 0.05$  از خود نشان دادند. طبق آنالیز مندرج در جدول شماره ۳ نتایج نشان می‌دهد که بیش‌ترین مقاومت مربوط به

جدول ۳: مقاومت به کلاس های مختلف و آنتی بیوتیکی مصرفی

کلاس پنی سیلین	کلاس تتراسیکلین	کلاس سفالوسپورین	کلاس ماکرولید	کلاس لینکوزامید	کلاس فلوروکینولون	کلاس آمینوگلیکوزید	کلاس کارباپنم
پنی سیلین متی سیلین	تتراسیکلین	سفازولین سفوکسیتین سفتری آکسون	اریترومایسین آزیترومایسین	کلیندامایسین	سیپروفلوکساسین	جنتامایسین	ایمی پنم
تعداد و درصد سویه های مقاوم به کلاس های آنتی بیوتیکی							
۵۰ (۱۰۰٪)	۴۷ (۹۴٪)	۴۱ (۸۲٪)	۴۱ (۸۲٪)	۴۰ (۸۰٪)	۲۰ (۴۲٪)	۵ (۱۰٪)	۴ (۸٪)

جدول ۴: جدول میزان MIC مربوط به آنتی بیوتیک سفوکسیتین

S ≤ 2		I				R ≥ 4		CLSL 2017
لوله ۸	لوله ۷	لوله ۶	لوله ۵	لوله ۴	لوله ۳	لوله ۲	لوله ۱	تعداد
≥ ۱	≥ ۲	≥ ۴	≥ ۸	≥ ۱۶	≥ ۳۲	≥ ۶۴	≥ ۱۲۸	
μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	
-	-	-	۱۲	۶	۱۰	۱۲	۱۰	۵۰
S. aureus								

جدول ۶: گروه بندی استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده براساس مقاومت

MDR	
مقاومت چندگانه	تعداد سویه های مقاوم
کلاس ۴	۵ (۱۰٪)
کلاس ۵	۹ (۱۸٪)
کلاس ۶	۱۷ (۳۴٪)
کلاس ۷	۱۳ (۲۶٪)
کلاس ۸	۴ (۸٪)
کلاس ۹	۲ (۴٪)
جمع	۵۰ (۱۰۰٪)

نتایج فراوانی ژن های *pvl* و *hla* نشان داد که از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۴۷ جدایه (۹۴٪) دارای ژن *hla* و ۱۰ جدایه (۲۰٪) دارای ژن *pvl* است (شکل های ۳ و ۴). لازم به ذکر است که براساس آزمون آماری کای مربع در سطح ۰/۰۵ رابطه معنی داری بین همزمانی حضور این دو ژن در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد لیکن بین حضور ژن *pvl* و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکی های پنی سیلین، متی سیلین و سفتریاکسون رابطه معنی داری مشاهده گردید.

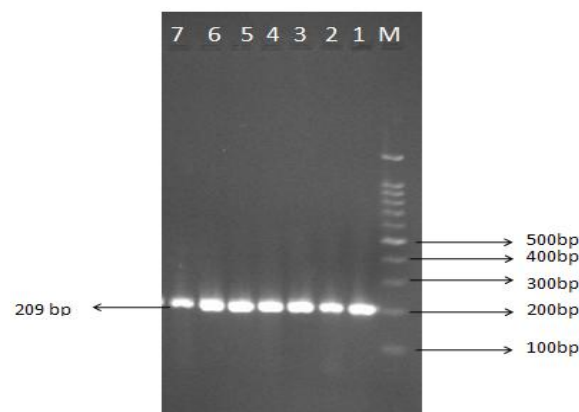
بر اساس آزمون کای مربع و در سطح معنی دار ۰/۰۵، بروز مقاومت همزمان در بین برخی از آنتی بیوتیک های مصرفی رابطه معنی داری را از خود نشان دادند. بدین معنی که مصرف همزمان آن ها به درمان هیچ کمکی نمی کند (جدول ۵).

جدول ۵: وجود ارتباط معنی دار بین همزمانی مقاومت های آنتی بیوتیکی

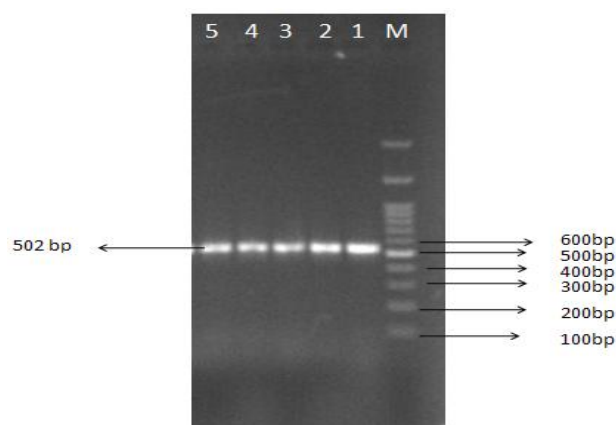
سفازولین	سفتریاکسون	تتراسیکلین	کلیندامایسین	آزیترومایسین
		۰/۰۲۳	۰/۰۴۸	۰/۰۰۱
۰/۰۴۳	۰/۰۱۵		۰/۰۱۲	آزیترومایسین
۰/۰۴۲				سفتریاکسون

نتایج بررسی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که تمام جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه (MDR) دارند. لازم به ذکر است که مقاومت به بیش از سه کلاس آنتی بیوتیکی نشانه MDR بودن است. این نتیجه گیری در جدول شماره ۶ به وضوح دیده می شود.

در سراسر جهان مطالعه‌های گسترده‌ای بر روی این باکتری صورت گرفته است. Rahimi و همکاران در سال ۱۳۹۵ مقاومت به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و سفوکسیتین را به ترتیب ۹۸٪، ۹۰٪ و ۶۸٪ و بیش‌ترین حساسیت را به سیپروفلوکساسین به میزان ۵۶٪ گزارش کرده اند (۱۸). Tahmasebi و همکاران در سال ۱۳۹۵ بیش‌ترین مقاومت را به پنی‌سیلین با ۹۵٪ و اریترومايسين با ۹۱٪ اعلام نمودند (۱۹). در تحقیقی دیگر Alizadeh در سال ۱۳۹۴ مقاومت به آزیترومایسین، لینزولید، اوفلوکساسین و متی‌سیلین را به ترتیب ۳۲٪، ۳۵٪، ۲۷٪ و ۲۷٪ گزارش نمودند (۳). Mulla Abbaszadeh و همکاران در سال ۱۳۹۰ طی ۳ سال متوالی در شهر تبریز مقاومت به پنی‌سیلین در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۱۰۰٪ گزارش کرده اند (۱۵). در پژوهشی Fathali و همکاران در سال ۱۳۹۵ با مطالعه بر روی ۲۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که ۹۵ جدایه نسبت به متی‌سیلین مقاومت ۱۰۰٪ داشته اند (۷). Ahmadi و همکاران در کرمانشاه گزارش کردند که مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسیکلین، متی‌سیلین و آمپی‌سیلین به ترتیب ۹۰٪، ۷۶٪، ۶۴٪ و ۵۵٪ و کم‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفوران‌تئوئین به میزان ۸٪ بوده است (۱). مطالعه Alvarez در سال ۲۰۱۲ در یک بیمارستان واقع در منطقه روستایی اندرپرادش هند نشان دادند که در بین ۱۱۹ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین مقاومت به سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، اریترومايسين و جنتامایسین و بیش‌ترین حساسیت به داکسی‌سایکلین، کلرامفنیکل و ریفامپین است (۴). مقایسه نتایج سایر نقاط با مطالعه حاضر مشخص می‌کند که در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش بالای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک شکل گرفته است. به طوری که میزان MIC محاسبه شده ۴ برابر بیش از حد معمول است و این خطر وجود دارد که در آینده به دلیل تنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی که در حال شکل‌گیری است، این مسئله به یک بحران درمانی تبدیل گردد. امروزه خانواده انتروباکتریاسه بیش‌تر مسئول عفونت مجاری ادراری در نظر گرفته می‌شود، لیکن در صورت عدم کنترل استفاده صحیح از دارو، این احتمال وجود دارد که در آینده سایر



شکل ۳: نتیجه انجام PCR برای شناسایی ژن *hla* روی ژل آگارز ۱٪. (M: مارکر، ۱-۶: نمونه‌های مثبت و ۷: کنترل مثبت)



شکل ۴: نتیجه انجام PCR برای شناسایی ژن *pvl* روی ژل آگارز ۱٪. (M: مارکر، ۱-۴: نمونه‌های مثبت و ۵: کنترل مثبت)

## بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به متی‌سیلین و پنی‌سیلین (۱۰۰٪) و کم‌ترین مقاومت به جنتامایسین (۱۰٪) و ایمپنم (۸٪) است. هم‌چنین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده همگی جزء گروه MDR است. باتوجه به نتایج به دست آمده درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که یک سوپرباگ<sup>۱</sup> محسوب می‌شود چالش برانگیز است. زیرا مصرف دارویی هم‌چون جنتامایسین که از خانواده آمینوگلیکوزیدها است می‌تواند عوارضی مانند درگیری سیستم شنوایی و یا عصبی به دنبال داشته باشند.

<sup>۱</sup>Superbugs

## نتیجه گیری

به طور کل نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان دهنده افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* است. این موضوع زمانی نگران کننده تر می شود که بدانیم نمونه های جمع آوری شده همگی مربوط به عفونت مجاری ادراری بوده اند که همین این موضوع می تواند عاملی برای تکرر عفونت ادراری باشد. هم چنین یافته های این پژوهش نشان دهنده همراهی مقاومت آنتی بیوتیکی با حضور ژن های جزایر بیماری زای نظیر *Pvl* و *hla* است. وجود هم زمان مقاومت آنتی بیوتیکی و فاکتورهای بیماری زایی می تواند در کودکان و یا افرادی که دچار نقصان سیستم ایمنی هستند، درمان را با مشکل روبرو کند.

موارد درگیر کننده عفونت مجاری ادراری نیز به معضلی بزرگ تبدیل شوند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه، ۴۷ (۹۴٪) جدایه واجد ژن *hla* و (۲۰٪) ۱۰ جدایه واجد ژن *Pvl* بوده اند. رحیم پور و همکاران (۱۸) در سال ۱۳۹۵ فراوانی ژن *pvl* در بین ۷۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* را (۲۰٪) ۱۰ جدایه، Tahmasebi و همکاران (۱۹) در سال ۱۳۹۵ فراوانی ژن *pvl* در بین ۶۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* را (۲۵٪)، Alizadeh (۳) در سال ۱۳۹۴ فراوانی ژن *pvl* در بین ۴۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* را (۲۵٪)، فتحعلی و همکاران (۹) در سال ۱۳۹۴ فراوانی ژن های *pvl* و *hla* در بین ۹۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب (۲۱٪/۴) و (۹۳٪) گزارش کردند. هم چنین هو و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژن *pvl* را (۲۸٪) گزارش کردند. Holmes و همکاران در انگلستان و ولز در سال ۲۰۰۵ دو جمعیت ۵۱۵ تایی و ۴۷۰ تایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* را برای تعیین فراوانی ژن *pvl* بررسی کردند. در جمعیت اول فراوانی را (۱/۶٪) و در جمعیت دوم (۴/۹٪) گزارش نمودند (۱۰).

هر دو ژن مورد مطالعه در این تحقیق در جزایر بیماری زایی ژنومی قرار گرفته اند و که به وسیله فازهای لیزوژن در بین *استافیلوکوکوس اورئوس* ها منتقل می شوند. علی رغم اینکه مقاومت ۱۰۰٪ نسبت به متی سیلین در بین ۵۰ نمونه مورد مطالعه مشاهده گردید، لیکن فقط ۲۰٪ نمونه ها واجد ژن *Pvl* بودند با این وجود بین حضور هم زمان این ژن و مقاومت به سه آنتی بیوتیک پنی سیلین، متی سیلین و سفتریاکسون از نظر آماری رابطه معنی داری در سطح  $p \leq 0/05$  وجود داشت. مقایسه سایر تحقیق ها با نتایج این پژوهش نشان می دهد که درصد ژن *pvl* نسبت به بسیاری از تحقیق های مشابه افزایش پیدا کرده است و با توجه به این که این ژن ۲ از ارکان بیماری زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* است چنین به نظر می رسد که اعضاء این جنس به سرعت در حال گسترش ذخیره ژنی خود به سایر هم نوعان هستند و همین موضوع می تواند چالش بزرگی را در کنترل آن ها در آینده نه چندان دور به وجود آورد.

1. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the Antibiotic Resistance Pattern in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples Obtained from Patients Hospitalised in Imam Reza Hospital, Kermanshah. J Microb World. 2014; 6(17): 299-311. [In Persian]
2. Akindolire MA, Babalola OO, Ateba CN. Detection of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* from Milk: A Public Health Implication. Int J Environ Res Public Health. 2015; 12: 10254-10275
3. Alizadeh S, Amini K. Identification of Virulence Gene Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) and Resistance to Methicillin (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens: A Short Report. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2015; 14(5): 427-34. [persian]
4. Alvarez-Uria G, Reddy R. Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Rural Area of India: is MRSA Replacing Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the Community. ISRN Dermatol. 2012; 2012:248951
5. Berube BJ, Bubeck WJ. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin nearly a century of intrigue. Toxins, 2013; 5(6): 1140-1166.
6. Deleo FR, Chambers HF. Soft Tissue Infections reemergence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in the Genomics Era. J Clin Invest. 2009; 119:2464-2474.
7. Fathali Z, Mirzaee M, Najjarpeerayeh S. Identification Sec, Hla, Pvl and Tsst-1 Toxins Genes Profile in of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. JIUMS. 2016; 24(4): 32-40. [In Persian]
8. Havaei A, Ahmadpour M, Poursina F, Ruzbahani M, Assadbeigi B. The Prevalence of Pantone-Valentine Leukocidin Gene in *Staphylococcus aureus* Isolated from Alzahra Hospital. JIMS. 2014; 32: 2217-2229. [In Persian]
9. Hochhut B, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity Islands and their role in bacterial virulence and survival. Contrib Microbiol. 2005; 12:234-254.
10. Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* Isolates Carrying Pantone-Valentine Leukocidin Genes in England and Wales: Frequency, Characterization, and Association with Clinical Disease. JCM. 2005; 43(5): 2384-2390
11. Hu Q, Cheng H, Yuan W, Zeng F, Shang W, Tang D. et al. Pantone-Valentine leukocidin (pvl)- Positive Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates are Associated with Skin and Colonized Mainly by Infective Pvl-Encoding Bacteriophages. JCM. 2015; 53: 67-72.
12. Inoshima N, Wang Y, Wardenburg JB. Genetic Requirement for Adam10 in Severe *Staphylococcus aureus* Skin Infection. J Invest Dermatol, 2012; 132:1513-1516.
13. Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 2010; 67: 3057-71.
14. Moraveji Z, Tabatabaei M, Shirzad Aski H, Khoshbakht R. Characterization of Hemolysins of *Staphylococcus* Strains isolated from Human and Bovine, Southern Iran. Iran J Vet Res. 2014; 15(4): 326-30.
15. MullaabasZadeh H, Islami K, Hamidi M, Bahmanabadi R, Mehrjooyan E. Frequency and Pattern of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Samples Clinical of Arad Hospital in Tehran - in 2009-2011. IJIDTM. 2013; 18: 49-53. [persian]
16. Patel JB, Weinstein MP, Eliopoulos GM. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. in: M100-S23, 27<sup>th</sup> ed, Pennsylvania. 2017; p:56-63.
17. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and Antibiotic Resistance Profiles of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains in Iran. Arch Virol. 2012; 157(9): 1807-1811.
18. Rahimi Hesari M, Mirzaie A, Salehzadeh A. Frequency of Methicillin Resistant (*mecA*) and Pantone-Valentine Leukocidin (pvl) Genes Among *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Clinical Samples of Rasht hospitals. J Microb World. 2016; 9(1): 34-43. [In Persian]
19. Tahmasebi H, Bokaeian M. The Study of Pantone Valentin Leukocidin (PVL) Gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Wound in Zahedan Iran. Armaghanedanesh. 2016; 21(6): 591-604. [In Persian]
20. Tajik S, Najjar Pirajeh S. Clinical Importance and Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (CA\_MRSA). J Lab Diag. 2012; 27: 56-68. [In Persian]
21. Thong KL, Junnie J, Liew FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibigrams and Molecular Subtypes of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* In local Teaching Hospital Malaysia. JMB. 2009; 19: 1265-7.
22. Tokajian S, Haddad D, Andraos R, Hashwa F, Araj G. Toxins and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from a major Hospital in Lebanon International Scholarly Research Network. ISRN Microbiol. 2011; ID 812049, 9 pages.
23. Tormo M<sup>Á</sup>, Ferrer MD, Maiques E, Ubeda C, Selva L, Lasa Í, Calvete J, Novick RP, Penadés JR. *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. J bacteriol. 2008; 190(7): 2434-2440.

24. Yıldız O, Coban A, Sener A, Kuner S, Bayramoglu G, Guducuoglu H. Antimicrobial Susceptibility and Resistance Mechanisms of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from 12 Hospitals in Turkey. BMC Biology. 2014; 13:44-50
25. Yu F, Liu Y, Xu Y, Shang Y, Lou D, Qin Z, Parsons C, Zhou W, Huang X, Li Y, Hu L, Wang L. Expression of Panton-Valentine Leukocidin mRNA among *Staphylococcus aureus* isolates Associates with Specific Clinical Presentations. PLoS One. 2013; 8(12): e83368.