مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم ، شماره سی و سوم-زمستان ۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

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

**مریم غلامی[۱]، عباسعلی رضائیان*[۲]**

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 عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری می‌تواند از طریق انتقال عمودی و افقی ژن‌های مقاومت زا را جابه‌جا نماید. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ، فراوانی ژن‌های *pvl*[۱] و *hla*[۲] که در جزایر بیماری‌زایی(SaPIs)[۳] قرار گرفته اند و روابط معنی‌دار بین آن‌ها است.

**مواد و. روش‌ها**: در این مطالعه مقطعی- توصیفی طی ۳ ماه ۱۰۷ نمونه باکتری‌های گرم مثبت مشکوک به جنس *استافیلوکوک* از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری جمع آوری شد. از تست‌های 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 ژن‌های *hla* و *pvl* با استفاده از پرایمرهای اختصاصیدر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*مورد ارزیابی قرار گرفتند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس‌ها* جدا شده به۱۳آنتی‌بیوتیک مختلف از طریق روش دیسک دیفیوژن و بر اساس جداول CLSI مورد بررسی گرفت و در آخر برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین تست MIC گذاشته شد.

**نتایج**: باتوجه به تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، ۵۰ جدایه به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شد. نتایج تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰٪) و متی سیلین (۱۰۰٪) و کم‌ترین مقاوت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های جنتامایسین (۵٪) و ایمی‌پنم (۴٪) بوده است. نتایج تست MIC نشان داد که مقدار تأثیرگذار آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین به بیش از۸µl/ml افزایش پیدا کرده است که این مقدار ۴ برابر بیش از حد استاندارد است. مطالعه نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*جزء گروه MDR هستند. هم‌چنین نتایج PCR نشان داد که ۹۴٪ جدایه‌ها حامل ژن *hla* و ۲۰٪ نیز حامل ژن *pvl* هستند.

**بحث**: نتایج حاصل از این تحقیق افزایش بیش از حد مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دربین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مجاری ادراری نشان می‌دهد. همراهی ژن‌های موجود در جزایر بیماری‌زایی هم‌چون *hla* و *pvl* می‌تواند بر وخامت موضوع افزوده و درمان عفونت این گونه باکتریایی را با دشواری روبرو نماید.

**واژه‌های کلیدی**: *استافیلوکوکوس اورئوس*، جرایر بیماری‌زایی ، *pvl* ، *hla* ، *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

[1] Panton–Valentine leukocidin
[2] α-hemolysin or α-toxin
[3] Staphylococcal pathogenicity islands

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

## مقدمه

*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 می‌توانددر انسان ودام 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، ارگانیسم 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)، باکتریوفاژها و جزایر بیماری‌زایی اشاره کرد (۶). عناصر متحرک ژنتیکی*استافیلوکوکوس اورئوس*ژن‌های بیماری‌زا و ژن های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را حمل می‌کنند. امروزه بسیاری از نژادهای *استافیلوکوکوس اورئوس*انسانی در برابر آنتی‌بیوتیک-های نظیر پنی‌سیلین و متی‌سیلین مقاوم شده‌اند. مقاومت در *استافیلوکوکوس*ها یا با تولید پروتئین‌هایی با میل ترکیبی پائین همانند PBP2a[1] به‌وسیله ژن *mecA* در گروه MRSA و یا به-وسیله آنزیم‌های بتا-لاکتامازی که از طریق پلاسمیدها و یا ترانسپوزون‌ها جهت تخریب آنتی‌بیوتیک کسب می‌شوند حاصل می‌گردد. همانند دریافت ژن *VanA* از *انتروکوکوس‌ها*که باعث پیدایش گروه VRSA شده است (۷).

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 فاژهای استافیلوکوکی هستند. اغلب آن‌ها ژن‌هایی را برای یک یا تعداد بیش‌تری از سوپرآنتی‌ژن‌ها حمل می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ۳ جزیره بیماری‌زایی ژنومیک (νSAα، νSAβ،νSAγوνSAγ) است. آلفاتوکسین در جزیره گاما یا νSAγ قرار گرفته است. علاوه برآلفا 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 *استافیلوکوک اورئوس* تولید می‌شوند که گلبول‌های خونی را لیز می‌کنند. آلفاتوکسین که یک همولیزین است توسطژن *h la*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 اورئوس‌های* دارای ژن مقاومت به متی‌سیلین که واجد جزیره بیماری‌زایی SCC هستند ، اغلب ژن لکوسیدین پنتون والنتین را نیز دارند. محل استقرار این دو ژن برروی ژنوم یک باکتریوفاژها لیزوژن phiSA2usa قرار داشته که پس از اکتساب افقی ، به‌وسیله باکتری بیان می شوند. *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 درقالب یک اپرون بیان می‌شوند( ۲،۱۳،۲۲).

هدف از این پژوهش بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* آلوده کننده مجاری ادراری، وضعیت مقاومت چندگاه 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.

[1] Penicillin binding protein 2a



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

## روش کار

**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 برروی محیط بلاد آگار ساخت شرکت مرک آلمان کشت و به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای۳۷درجه 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 کوآگولاز ، تست اندونوکلئاز 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 به‌طور مجزا، مقدار ۲۰۰µl آب مقطر استریل ریخته شد و سپس تعداد ۵-۳ کلنی از هر نمونه استافیلوکوکوس به‌طور مجزا به آن‌ها آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شدند. لوله‌ها به مدت ۶ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm-سانتریفیوژ و در ادامه مایع روی رسوب که حاوی DNA باکتری بود جدا گردید و دمای۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۴).

**شناسایی جنس استافیلوکوکبا روش مولکولی PCR**: جهت تأیید جنس *استافیلوکوکوس*هایی که به‌روش فنوتیپی تشخیص داده شده بودند، از آزمون PCR استفاده شد. به‌همین منظور از پرایمر اختصاصی ژن*16S rRNA* (جدول ۱) و طبق برنامه دمایی ارئه شده در (جدول۲) استفاده گردید (۲). سپس برای تفکیک *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر *استافیلوکوکوس*ها از پرایمر اختصاصی ژن *coa* ( آنزیم کواگولاز) ارائه شده در (جدول ۱) و برنامه دمایی (جدول۲) 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 والنتین لوکوسیدین) از پرایمرهای اختصاصی جدول ۱ و برنامه دمایی جدول ۲ استفاده شد.

جدول۱: توالی‌های پرایمر مورد استفاده

| ژن | پرایمر Sequence (5'->3') | طول | سایز (bp) | رفرنس |
|---|---|---|---|---|
| ***16S rRNA*** | **Forward**: GTAGGTGGCAAGCGTTACC<br>**Reverse**: CGCACATCAGCGTCAG | ۱۹<br>۱۶ | ۲۲۹ | ۱۱ |
| ***Coa*** | **Forward**:ACCACAAGGTACTGAATCAACG<br>**Reverse**: TGCTTTCGATTGTTCGATGC | ۲۲<br>۲۰ | ۸۲۱ | ۷ |
| ***hla*** | **Forward**:CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG<br>**Reverse**: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT | ۲۷<br>۲۵ | ۷۴۴ | ۱۴ |
| ***pvl*** | **Forward:** GGAAACATTTATTCTGGCTATAC<br>**Reverse:**CTGGATTGAAGTTACCTCTGG | ۲۳<br>۲۱ | ۵۰۲ | ۱۶ |

جدول ۲: برنامه دمایی جهت آزمون PCR ژن‌ها مورد مطالعه

| Gene | Initial denaturation | Denaturation | Annealing | Extension | Final Extension | Cycle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***16S rRNA*** | ۹۴°C ۴ min | ۹۴°C ۳۰sec | ۸۰°C ۳۰sec | ۷۲°C ۱ min | ۷۲°C ۵ min | ۳۰ |
| ***Coa*** | ۹۴°C ۴ min | ۹۴°C ۳۰sec | ۸۰°C ۳۰sec | ۷۲°C ۱ min | ۷۲°C ۵ min | ۳۰ |



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴۰ | ۷۲°C ۵ min | ۷۲°C ۱ min | ۵۸°C۱ min | ۹۴°C ۱ min | ۹۴°C ۷ min | ***hla*** |
| ۴۰ | ۷۲°C ۵ min | ۷۲°C ۱ min | ۶۰°C ۴۰sec | ۹۴°C ۴۰sec | ۹۴°C ۵ min | ***pvl*** |

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 الگو (با غلظت ۷۰ng/µl و خلوص ۱/۸ خوانده شده با دستگاه نانودراپ) انجام شد. محصول PCR، برروی ژل آگارز ۱٪ و با ولتاژ ۹۰ به‌مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.اندازه باندهای به‌دست آمده با استفاده از مارکر ۱۰۰bpدر دستگاه ژل داکیومنتیشن 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 درتشخیص ایزوله‌ها استفاده گردید(۲۲،۲۵).

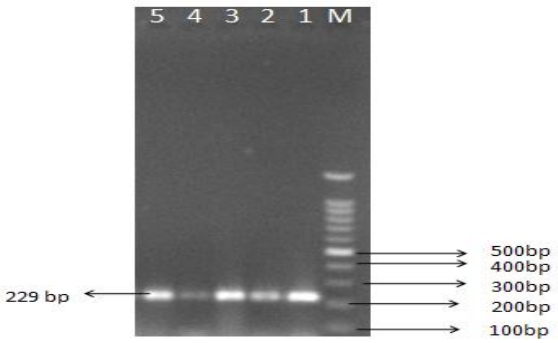
**آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی:** برای *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰units)، متی‌سیلین (۵µg)، سفازولین(۳۰µg)، سفتریاکسون(۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)،آزیترومایسین (۱۵µg)،اریترومایسین (۱۵µg)، تتراسیکلین (۳۰µg)، کلیندامایسین (۲µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg) و هم‌چنین وانکومایسین (۳۰µg) 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 متی-سیلین و اکساسیلین از آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین و بر مبنای رقت‌سازی تست MIC گذاشته شد (۱۶).

**آنالیز آماری داده‌ها:** برای تجزیه وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ver20 و هم‌چنین با استفاده از آزمون One Sample 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 *استافیلوکوکوک* بوده است. این نتیجه‌گیری با توجه به آزمون مولکولی PCR و استفاده از ژن *16S rRNA* نیز مورد تأیید قرار گرفت (شکل۱ ).



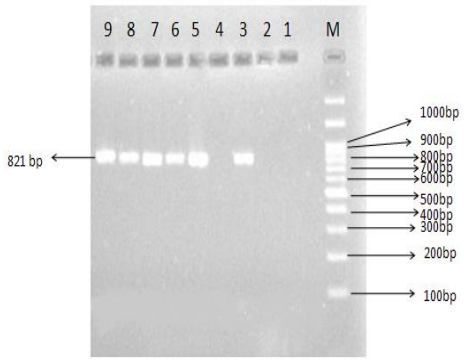

شکل ۱: نتیجه انجام PCR برای شناسایی حضور ژن *16S rRNA* روی ژل آگارز ۱٪

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

نتایج غربالگری جنس *استافیلوکوک* نشان داد که از ۹۲ جدایه تأیید شده به‌عنوان جنس استافیلوکوک با توجه به استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *coa* تعداد ۵۰ جدایه مربوط به گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. لازم به‌ذکر است که تست-های مانیتول سالت آگار، کواگولاز و اندونوکلئاز مقاوم به حرارت برای تمام این ۵۰ جدایه مثبت بوده است (شکل۲).

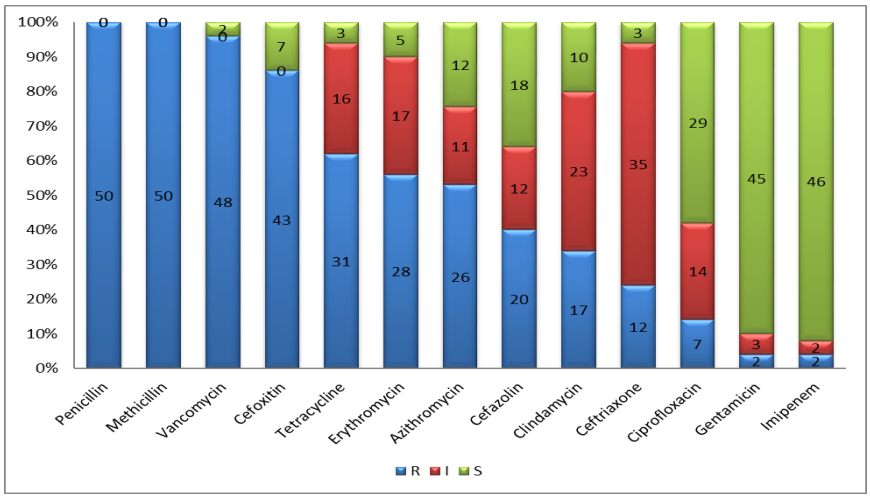
[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]




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)

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




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

براساس آزمون One Sample T Test در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*مورد مطالعه نسبت به پنی-سیلین، متی‌سیلین، وانکومایسین، سفوتاکسیم، تتراسیکلین، اریترومایسین و آزیترومایسین مقاومت معنی‌داری را درسطح $p\leq ۰/۰۵$ از خود نشان دادند. طبق آنالیز مندرج در جدول شماره ۳ نتایج نشان می‌دهد که بیش‌ترین مقاومت مربوط به پنی‌سیلین و تتراسیکلین وکم‌ترین 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 ۸ µg/ml افزایش پیدا کرده است.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

جدول ۳: مقاومت به کلاس‌های مختلف و آنتی‌بیوتیکی 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 سویه‌های مقاوم به کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی | | | | | | | |
| 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

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

بر اساس آزمون کای‌مربع و در سطح معنی‌دار ۰/۰۵، بروز مقاومت هم‌زمان در بین برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی رابطه معنی‌داری را از خود نشان دادند.بدین معنی که مصرف هم‌زمان آن‌ها به درمان هیچ کمکی نمی‌کند (جدول۵) .

جدول ۵: وجود ارتباط معنی‌دار بین هم‌زمانی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی

| | آزیترومایسین | کلیندامایسین | تتراسیکلین | سفتریاکسون | سفازولین |
|---|---|---|---|---|---|
| **اریترومایسین** | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۴۸ | ۰/۰۲۳ | | |
| **آزیترومایسین** | | ۰/۰۱۲ | | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۴۳ |
| **سفتریاکسون** | | | | | ۰/۰۴۲ |

نتایج بررسی مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمام جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) دارند. لازم به ذکر است که مقاومت به بیش از سه کلاس آنتی‌بیوتیکی نشانه MDR بودن است. این نتیجه-گیری در جدول شماره ۶ به‌وضوح دیده می‌شود.

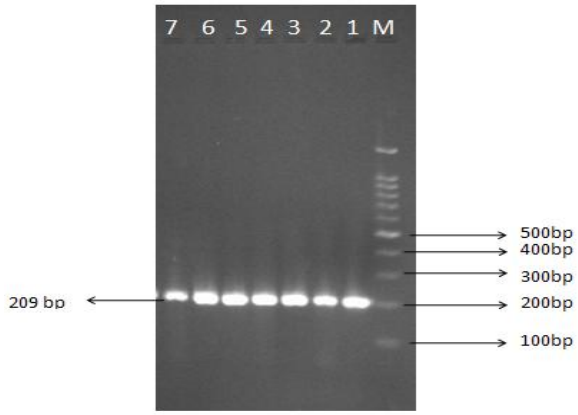
جدول ۶: گروه بندی *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده براساس مقاومت MDR

| تعداد سویه‌های مقاوم | مقاومت چندگانه |
|---|---|
| ۵(٪۱۰) | ۴ کلاس |
| ۹(٪۱۸) | ۵ کلاس |
| ۱۷(٪۳۴) | ۶ کلاس |
| ۱۳(٪۲۶) | ۷ کلاس |
| ۴(٪۸) | ۸ کلاس |
| ۲(٪۴) | ۹ کلاس |
| **۵۰(٪۱۰۰)** | **جمع** |

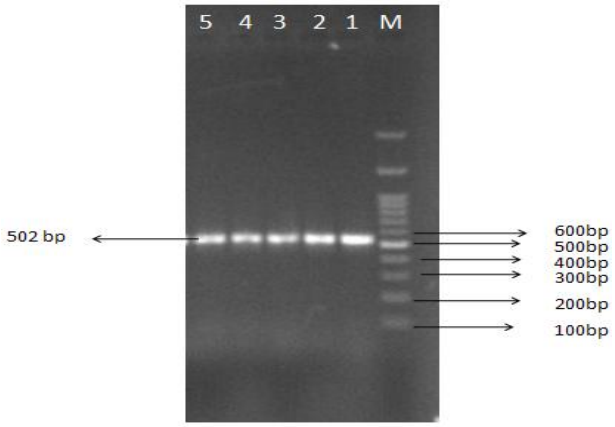
نتایج فراوانی ژن‌های *hla* و*pvl* نشان داد که از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۴۷ جدایه ( ۹۴٪) دارای ژن*hla*و ۱۰ جدایه (٪۲۰) دارای ژن *pvl*است (شکل‌های ۳ و ۴). لازم به‌ذکر است که براساس آزمون آماری کای مربع در سطح ۰/۰۵رابطه معنی‌داری بین هم‌زمانی حضور این دو ژن درجمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد لیکن بین حضور ژن *pvl* و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکی‌های پنی‌سیلین، متی‌سیلین و سفتریاکسون رابطه معنی‌داری مشاهده گردید.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]




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




شکل ۴: نتیجه انجام PCR برای شناسایی ژن *pvl* روی ژل آگارز ۱٪
(M: مارکر ، ۴-۱: 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 کم-ترین مقاومت به جنتامایسین (۱۰٪) و ایمی‌پنم (۸٪)است. هم-چنین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده همگی جزء گروه MDR است. باتوجه به نتایج به‌دست آمده درمان عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس*که یک سوپرباگ[1] محسوب می-شود چالش برانگیز است. زیرا مصرف دارویی هم‌چون جنتامایسین که از خانواده آمینوگلیکوزیدها است می‌توانند عوارضی مانند درگیری سیستم شنوایی و یا عصبی به دنبال داشته باشند.

در سراسر جهان مطالعه‌های گسترده‌ای برروی این باکتری صورت گرفته است. Rahimi و همکاران درسال ۱۳۹۵ مقاومت به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و سفوکسیتین را به‌ترتیب 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 اریترومایسین با ۹۱٪ اعلام نمودند (۱۹). در تحقیقی دیگر Alizadeh در سال ۱۳۹۴ مقاومت به آزیترومایسین، لینزولید، اوفلوکساسین و متی‌سیلین را به‌ترتیب ۳۲/۵٪، ۳۵٪، ۵/۲۷٪ و ۲۷/۵ ٪ گزارش نمودند (۳). Mulla Abbaszadeh و همکاران درسال 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 برروی 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 به‌ترتیب ۹۰٪ ، ۷۶٪ ، ۶۴٪ و ۵۵٪ وکم‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانتوئین به میزان ۸٪ بوده است (۱). مطالعه Alvarez در سال ۲۰۱۲ در یک بیمارستان واقع در منطقه روستایی اندراپرادش هند نشان دادند که در بین ۱۱۹ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش-ترین مقاومت به سیپروفلوکساسین، کوتریموکسازول، اریترومایسین و جنتامایسین و بیش‌ترین حساسیت به داکسی-سایکلین، کلرامفنیکل و ریفامپین است (۴). مقایسه نتایج سایر نقاط با مطالعه حاضر مشخص می‌کند که در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* افزایش بالای مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک شکل گرفته است. به‌طوری‌که میزان MIC محاسبه شده ۴ برابر بیش از حد معمول است واین خطر وجود دارد که درآینده به‌دلیل تنوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی که درحال شکل-گیری است، این مسئله به یک بحران درمانی تبدیل گردد. امروزه خانواه انتروباکتریاسه بیش‌تر مسئول عفونت مجاری ادرای در نظر گرفته می‌شود، لیکن درصورت عدم کنترل استفاده صحیح از دارو، این احتمال وجود دارد که در آینده سایر

[1] Superbugs



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

موارد درگیر کننده عفونت مجاری ادرای 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* بوده‌اند. رحیم پور و همکاران (۱۸) درسال 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 بین۴۰ جدایه *استافیلوکوکوس* را (۲/۵٪)، فتحعلی و همکاران (۹) در سال ۱۳۹۴ فراوانی ژن‌های *pvl* و *hla* در بین ۹۵جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* را به‌ترتیب (۴/٪۲۱) و (۹۳٪) گزارش کردند. هم‌چنین 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 ۵۱۵تایی و ۴۷۰تایی 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 به‌وسیله فاژهای لیزوژن در بین *استافیلوکوکوس اورئوس*ها منتقل می‌شوند. علی‌رغم اینکه مقاومت ۱۰۰٪ نسبت به متی‌سیلین در بین ۵۰ نمونه مورد مطالعه مشاهده گردید، لیکن فقط ۲۰٪ نمونه‌ها واجد ژن *Pvl* بودند با این وجود بین حضور هم‌زمان این ژن و مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، متی‌سیلین و سفتریاکسون از نظر آماری رابطه معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشت. مقایسه سایر تحقیق‌ها با نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درصد ژن *pvl* نسبت به بسیاری از تحقیق‌های مشابه افزایش پیدا کرده است و با توجه به این‌که این ۲ ژن از ارکان بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* است چنین به‌نظر می‌رسد که اعضاء این جنس به سرعت در حال گسترش ذخیره ژنی خود به سایر هم‌نوعان هستند وهمین موضوع می‌تواند چالش بزرگی را در کنترل آن‌ها در آینده نه چندان دور به‌وجود آورد.

## نتیجه‌گیری

به‌طور کل نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان دهنده افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* است. این موضوع زمانی نگران کننده‌تر می‌شود که بدانیم نمونه‌های جمع‌آوری شده همگی مربوط به عفونت مجاری ادراری بوده‌اند که همین این موضوع می‌تواند عاملی برای تکرر عفونت ادراری باشد. هم‌چنین یافته‌های این پژوهش نشان دهنده همراهی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با حضور ژن‌های جزایر بیماری‌زای نظیر *Pvl* و *hla* است. وجود هم‌زمان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای بیماری‌زایی می‌تواند در کودکان و یا افرادی که دچار نقصان سیستم ایمنی هستند، درمان را با مشکل روبرو کند.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

# منابع


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 aureusfrom Milk: A Public Health Implication.Int J Environ Res Public Health. 2015; 12: 10254-10275

3.Alizadeh S, Amini K. Identification of Virulence Gene Panton-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. [persion]

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* α-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 cInvest. 2009; 119:2464–2474.

7.Fathali Z, Mirzaee M, Najarpeerayeh 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 Panton-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 aureusIsolates Carrying Panton-Valentine Leucocidin 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. Panton-Valentine leukocidin (pvl)- Positive Health Care-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureusIsolates are Associated with Skin and and Colonized Mainly by InfectivePvl-Encoding Bacteriophages. JCM. 2015; 53: 67-72.

12.Inoshima N, Wang Y, Wardenburg JB. Genetic Requirement for Adam10 in Severe Staphylococcus aureusSkin 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 StaphylococcusStrains 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.[persion]

16.Patel JB, Weinstein MP, Eliopoulos GM. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. in: M100-S23, 27rd 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 Panton-Valentine Leucocidin (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,LiewFY, Yusof MY,Hanifah YA. Antibiograms 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 MÁ, 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.


[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]

24.YıldızO, 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 ,XuY ,ShangY ,LouD ,QinZ ,ParsonsC ,ZhouW ,HuangX ,LiY ,HuL , Wang L. Expression of Panton-Valentine Leukocidin mRNA among *Staphylococcus aureus* isolates Associates with Specific Clinical Presentations.PLoS One. 2013; 8(12): e83368.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-11-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.2.6 ]