مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۱ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۹۶، ۶۱۷-۶۱۰

مقاله پژوهشی

شناسایی ژن‌های بیماری‌زا(*et* A،B و *tst*) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی(*mec*A) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR

فاطمه محمد جانی[۱]، دکتر کیومرث امینی[۲]

دریافت مقاله : تیر ۱۳۹۶
پذیرش مقاله : آذر ۱۳۹۶

*نویسنده مسئول :
دکتر کیومرث امینی؛
دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه

Email :
dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویرولانس متعددی از قبیل توکسین ها، فاکتورهای تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی و اگزوآنزیم ها را تولید می‌کنند. این مطالعه به‌منظور شناسایی فاکتورهای مرتبط با ویرولانس و مقاومت(*etA*، *etB*، *tst*، *mecA* و *femA*) در استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه ی توصیفی- مقطعی، درمجموع ۶۰ استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان شریعتی در تهران جمع‌آوری شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی به چندین عامل ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار از دیسک و مطابق با دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالین انجام شد. پس از استخراج DNA، Multiplex-PCR به‌منظور تکثیر *etA*، *etB*، *tst*، *mecA* و *femA* بر روی تمامی ایزوله‌های کلینیکی انجام شد.

یافته ها: در این مطالعه، تمامی ۶۰ ایزوله(۱۰۰٪) ازنظر وجود ژن *femA* مثبت بودند. بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب مربوط به اریترومایسین و سفوکسیتین بود. تعداد ۳۳/۳٪(N;۲۰) و ۴۳/۳٪(N;۲۶) از ایزوله به ترتیب ژن‌های *etb* و *tst* را حمل می‌کنند. همه‌سویه‌ها برای ژن *eta* منفی بودند.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان داد که در میان فاکتورهای زیاد تولیدشده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، *etb* و *tst* نقش مهمی در پاتوژنز عفونت‌های استافیلوکوکی دارند. این نتایج نشان داد که شناسایی سویه‌های MRSA با استفاده از دیسک cefoxitin (در مقایسه اگزاسیلین) و یا PCR برای ژن *mecA* انجام شود.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت، Multiplex PCR

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

[۲] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت به‌طورمعمول از پوست و بینی افراد سالم جدا می‌شود. این باکتری یکی از شایع‌ترین پاتوژن های فرصت‌طلب است که می‌تواند در سطوح مختلفی ازجمله سطح بدن کلونیزه شود و به علت فاکتورهای ویرولانس متعدد سبب طیفی از عفونت‌های پوستی و مسمومیت‌های غذایی و عفونت‌های بیمارستانی، عفونت پوست و بافت نرم، عفونت‌های داخل عروقی، پنومونی، آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، استئومیلیت، عفونت جسم خارجی و سپسیس شود(۱). در برخی از سویه ها سوپرآنتی ژن های توکسین پیروژنیک(Pyrogenic toxin super antigens (PTSAg)) شامل: اکسفولیاتیو توکسین A و B (exfoliative toxin B (etA/B)) و توکسین سندرم شوک سمی(TSST-1) می‌باشند که سبب بیماری‌های خطرناک ازجمله زرد زخم تاولی، سندرم فلسی‌شدن پوست استافیلوکوکی(Scalded skin syndrome)، سندرم رایتر و سندرم شوک توکسیک(TST) به‌ویژه در کودکان و افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند، می‌شود(۲). توکسین های اکسفولیاتیو که آن‌ها را اپیدرمولایتیک توکسین نیز می‌نامند، توسط ژن *et* کد می‌شوند که دارای سه ایزوفرم(A/B/D) می‌باشند که ژن *eta* کد کننده ی اکسفولیاتیو توکسین نوع A و بر روی یک پروفاژ، *etb* کد کننده ی توکسین ETB و بر روی یک پلاسمید بزرگ قرار دارند و ژن *etd* نیز محدود به جزایر بیماری زایی است. شایع‌ترین توکسین اکسفولیاتیو جداشده از انسانی، ایزوفرم های *ETA* و *ETB* هستند. توکسین های اکسفولیاتیو سرین پروتئازهایی با ویژگی سوبسترایی بالا هستند که قدرت تشخیص انتخابی و هیدرولیز پروتئین‌های دسموزومال را دارند(۴و۳). سندرم شوک توکسیک یک بیماری سیستمیک است که اولین بار توسط Todd معرفی شد(۵). سه تیپ مختلف از توکسین TSST-1 به نام های A، B و C وجود دارند که عامل بیش از ۷۵٪ تمامی موارد سندرم شوک توکسیک را شامل می‌شوند. این توکسین تقریباً توسط تمام سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به دوره‌ی قاعدگی و تعداد زیادی از سویه‌های غیر وابسته به قاعدگی سنتز می‌شود. همچنین این پروتئین در ایزوله‌های جداشده از افراد سالم نیز دیده شده است(۶). سندرم شوک سمی با رهاسازی توکسین به جریان خون آغاز می‌شود و در مرحله ی اول بیماری علائمی مانند: تب بالا، راش ماکولار گسترده، تهوع، استفراغ، اسهال، میالژی، گلودرد و سردرد، پرخونی حلق و افت فشارخون دیده می‌شود. در مرحله ی دوم علائم شدیدتر شده و با میوکاردیت، ایجاد اختلال در عملکرد کلیه‌ها، ادم، اختلال تنفسی، فلسی‌شدن پوست و اختلالات عصبی توأم می‌گردد که در صورت عدم درمان می‌تواند منجر به مرگ شود(۷).

از مهم‌ترین مشکلات در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی بروز بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پتانسیل بالای کسب ژن‌های خارجی در جهت بروز این مقاومت‌ها می‌باشد. سویه‌های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) تهدید جدی در عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و جامعه به شمار می‌آیند و روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازند(۸). یک سال پس از معرفی متی‌سیلین(یک پنی‌سیلین نیمه سنتزی و مقاوم به پنی‌سیلیناز) به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک جدید اولین بار از مقاومت در سال ۱۹۶۱ از انگلستان گزارش گردید. مکانیسم اصلی مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس تولید پروتئین جدیدی به نام PBP2a است که میل ترکیبی کم با بتالاکتام ها دارد و سبب مقاومت به بتالاکتام ها می گردد. PBP2a با ژن *mecA* کدگذاری می‌گردد و با کاست ژنی (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) SCCmec منتقل می‌شود و در کروموزوم سویه‌های مقاوم قرار دارد. در حال حاضر مقاومت دارویی در بین استافیلوکوک ها باعث بروز مشکلات زیادی در درمان عفونت های حاصل از این باکتری شده است(۹).

بنابر اهمیت موضوع مقاومت های دارویی در سویه‌های باکتریایی مولد عفونت‌های بالینی و بروز طیف وسیعی از عفونت‌ها از عفونت‌های ساده نظیر جوش و کورک تا عفونت‌های تهدیدکننده‌ی حیات نظیر سندرم شوک سمی، اندوکاردیت و استئومیلیت، هدف از تحقیق پیش رو شناسایی ژن‌های *mecA*، *femA*، *tst*، *etb*، *eta* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه که به‌صورت توصیفی-مقطعی(Cross-sectional) و در یک بازه زمانی یک‌ساله(۱۳۹۵-۱۳۹۴) انجام شد، تعداد ۶۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی(واقع در تهران) که شامل خون(۲۰ نمونه؛ ۳۳/۳٪)، زخم(۱۶ سویه؛ ۲۶/۶٪)، خلط(۱۱ سویه؛ ۱۸/۳٪)، لاواژ برونکوآلوئولار

(BAL) (۵ ایزوله؛ ۸/۳٪)، تراشه(۴ ایزوله؛ ۶/۶٪) و ادرار(۴ ایزوله؛ ۶/۶٪) جمع‌آوری گردید. پس از انتقال سویه ها بر روی محیط آگار خون‌دار(شرکت مرک، کشور آلمان) به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ایزولاسیون و شناسایی سویه ها بر اساس تست‌های استاندارد شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، رشد در مانیتول سالت آگار و DNase انجام شد. به‌منظور حفظ نمونه‌های تأییدشده، تمامی آن‌ها به محیط آبگوشت مغذی تریپتیک سوی براث(TSB) (شرکت مرک، کشور آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول تلقیح و در دمای زیر ۷۰ درجه سلسیوس ذخیره شد.

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار(مرک، آلمان) و با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های(تهیه‌شده از شرکت Mast، انگلیس)؛ آمپی‌سیلین(۳۰۰ µg)، جنتامایسین(۳۰ µg) آموکسی کلاو(۲۰ µg)، سیپروفلوکساسین(۵ µg)، اریترومایسین(۵ µg)، اگزاسیلین(۵ µg) و سفوکسیتین(۳۰ µg) بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین(۱۰) انجام شد. واکنش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش کربی بائر و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI پس از تهیه‌ی غلظت نیم مک فارلند از باکتری و کشت سفره‌ای یا چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام گردید. سوسپانسیون تهیه‌شده به‌وسیله‌ی سوآپ استریل پنبه ای روی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت متراکم کشت داده شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند و محیط کشت به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد. بعد از آن قطر هاله ی عدم رشد به‌وسیله‌ی خط کش اندازه گرفته شد و با استانداردهای جهانی(CLCI) مقایسه گردید و به‌صورت مقاوم(Resistant (R)، نیمه حساس(Intermediate (I) و حساس (Sensitive (S) گزارش شد.

به‌منظور تکثیر ژن‌های *eta*، *etb*، *tst*، *mecA* و *femA* ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. جهت تائید درجه خلوص DNA استخراج‌شده ($OD_{260/280}$=1.8-2nm) از دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر ترمو (Therm) (سوئد) استفاده شد. از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرهایی از قبل موجود و فهرست شده در جدول یک استفاده شد(جدول۱)(۴). پس از BLAST پرایمرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI، واکنش M-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X(سیناکلون، ایران) حاوی(۰/۰۵ U/µl) Taq DNA polymerase، (۳ Mm MgCl۲) و (۰/۴ mM) dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو(۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط زیر عبارتند از؛ دناتوراسیون(denaturation) ۹۴ درجه سلسیوس ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر(annealing) ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، طویل شدن(extension) ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶ دقیقه انجام شد. در این مطالعه از سویه ی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به‌عنوان کنترل مثبت و اشریشیا کلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه

ژن	توالی الیگونوکلئوتیدی (3′ → 5′)	طول قطعه ی آمپلیکون (bp)
fem-A	F=5′- TTACAGAGTTAACTGTTACC-3′	۶۵۱
	R=5 ′ - ATACAAATCCAGCACGCTCT-3′	
mecA	F=5′ -ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3′	۱۶۳
	R=5′-CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3′	
eta	F=5′-GCAGGTGTTGATTTAGCATT-3′	۹۳
	R=5′ -AGATGTCCCTATTTTTGCTG-3′	
etb	F=5′-ACAAGCAAAAGAATACAGCG-3′	۲۲۶
	R=5′-GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG -3′	
tst	F=5′-ACCCCTGTTCCCTTATCATC-3′	۳۲۶
	R=5′-TTTTCAGTATTTGTAACGCC-3′	

یافته‌ها

جدول ۲: الگوی حاصل از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های مورد بررسی

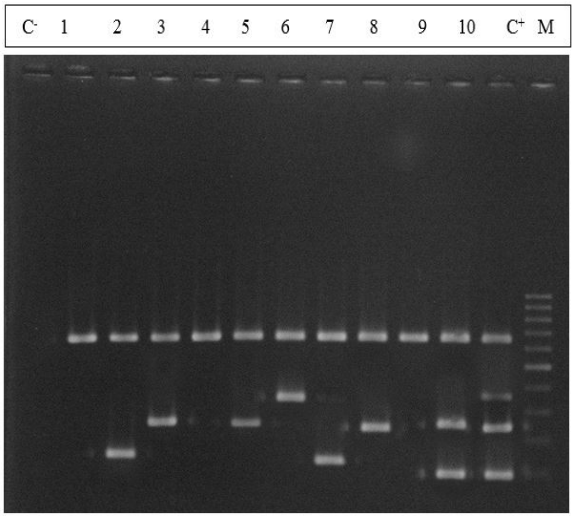
دیسک آنتی‌بیوتیکی (Mast، انگلیس)	الگوی به‌دست‌آمده از نتایج آنتی بیوگرام		
	تعداد و درصد سویه های مقاوم(R)	تعداد و درصد سویه های نیمه حساس(I)	تعداد و درصد سویه های حساس(S)
آمپی‌سیلین(۳۰۰ µg)	۴۱(۶۸/۳٪)	۲(۳/۳٪)	۱۷(۲۸/۳٪)
جنتامایسین(۳۰ µg)	۳۸(۶۳/۳٪)	۵(۸/۳٪)	۱۷(۲۸/۳٪)
اریترومایسین(۵ µg)	۵۱(۸۵٪)	۰(۰/۰٪)	۹(۱۵٪)
آموکسی کلاو(۲۰ µg)	۳۸(۶۳/۳٪)	۴(۶/۶٪)	۱۸(۳۰٪)
سیپروفلوکساسین(۵ µg)	۲۷(۴۵٪)	۱(۱/۶٪)	۳۲(۵۳/۳٪)
اگزاسیلین(۱ µg)	۱۶(۲۶/۶٪)	۰(۰٪)	۴۴(۷۳/۳٪)
سفوکسیتین(۳۰ µg)	۲۱(۳۵٪)	۰(۰٪)	۳۹(۶۵٪)

نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب متعلق به اریترومایسین(۸۵٪) و سفوکسیتین(۳۵٪) بود. نتایج تست انتشار از ژل در مطالعه ی حاضر نشان داد که از ۶۰ سویه ی مورد بررسی، ۲۱ ایزوله(۳۵٪) دارای مقاومت به دیسک سفوکسیتین بودند و درنتیجه به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) در نظر گرفته شدند.

جدول ۳: فراوانی ژن‌های مورد مطالعه

سویه ی مورد مطالعه	ژن‌های مورد مطالعه					تعداد نمونه
	tst	*etb*	*mecA*	*femA*	*eta*	
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۶(۴۳/۳٪)	۲۰(۳۳/۳٪)	۲۱(۳۵٪)	۶۰(۱۰۰٪)	۰(۰/۰٪)	۶۰

در مطالعه فوق تمامی ۶۰ نمونه(۱۰۰٪) ازنظر وجود ژن *femA* مثبت بودند و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، کمترین و بیشترین تعداد نمونه مربوط به ژن *eta* با تعداد ۰ نمونه(۰/۰٪) و ژن *tst* در ۲۶ ایزوله(۴۳/۳٪) از نمونه‌ها شناسایی گردید. در مطالعه ی پیش رو ژن انتروتوکسین *a* در هیچ‌کدام از سویه ها یافت نشد. همچنین ۲۱ ایزوله ازنظر وجود قطعه ژنی *mecA* مثبت بودند و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(*MRSA*) در نظر گرفته شدند که نتایج حاصل از آن در جدول ۳ ذکر گردیده است.



شکل ۱: محصول M- PCR بر روی ژل آگار(، به ترتیب از چپ به راست، کنترل منفی(اشریشیا کلی ATCC25922)، چاهک‌های ۱۰-۱: ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل مثبت(استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)،M: نشانگر ۱۰۰ bp (100 bp DNA Ladder)، قطعات 651bp، 163bp، 226bp و 326bp به ترتیب مربوط به ژن‌های *femA*، *mecA*، *etb* و *tst* می‌باشند

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن شایع در جهان است که به‌عنوان دومین باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، سویه‌های خاصی از این باکتری هستند که به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله متی‌سیلین مقاوم می‌باشند. سویه‌هایی از MRSA که بیشتر در بیمارستان‌ها دیده شد به نام (Healthcare-Acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) HA-MRSA یا به‌اصطلاح، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان می‌گویند. اما در حال حاضر، سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus CA-MRSA نیز در حال گسترش می‌باشند. سویه‌های CA-MRSA برخلاف HA-MRSA، ارتباطی با بستری شدن در بیمارستان ندارند(۱۱).

در مطالعه ی فوق تمامی ۶۰ نمونه(۱۰۰٪) ازنظر وجود ژن *femA* مثبت بودند و به‌عنوان استاف اورئوس در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، کمترین و بیشترین تعداد نمونه مربوط به ژن *eta* با تعداد ۰ نمونه(۰/۰٪) و ژن *tst* در ۲۶ ایزوله(۴۳/۳٪) از نمونه‌ها شناسایی گردید. همچنین ۲۱ ایزوله ازنظر وجود قطعه ژنی *mecA* مثبت بودند و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) در نظر گرفته شدند. شکری و همکارانشان در سال ۱۳۹۳ با بررسی ۱۷۶ نمونه بالینی جمع‌آوری‌شده از بخش‌های مختلف بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان، نشان دادند که فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵/۵٪(۴۵ مورد) بود که ۲۶ مورد(۵۷/۷٪) حاوی ژن مقاومت به متی‌سیلین بودند(۱۲). در مطالعه‌ای که توسط Cesur و Cokça در سال ۲۰۰۴ در بیمارستانی در ترکیه با ۵۰۰ بیمار بستری انجام شد فراوانی سویه‌های MRSA در بینی حدود ۶٪ تعیین شد(۸). علت اختلافات مشاهده‌شده در مطالعات فوق‌الذکر بامطالعه پیش رو می‌تواند در نوع نمونه، تعداد نمونه و فاصله ی جغرافیایی باشد. نتیجه ی ۵ سال تلاش Onanuga و Oghenekparobo Awhowho که در سال ۲۰۱۲ منتشر شد، حاکی از آن بود که فراوانی MRSSA در سال ۱۹۹۶ تنها ۱/۷٪، در سال ۱۹۹۷ حدود ۵/۵٪، در سال ۱۹۹۸ نیز ۵/۶٪ بود و این میزان در سال ۱۹۹۹ به بالاترین مقدار خود یعنی حدود ۶/۵٪ رسید. در سال ۲۰۰۰ با کمی کاهش این میزان ۵/۲٪ تعیین شد. می‌توان چنین پیش‌بینی کرد که برنامه‌های کنترل MRSA در این مورد مؤثر بوده است(۱۳). از مجموع ۶۶۴۰ نمونه ی بررسی‌شده در مطالعه ی رازین و همکاران، تعداد ۱۴۳(۲/۱٪) استافیلوکوک اورئوس به دست آمد که ۱۱۳ نمونه(۷۹٪) MRSA و ۳۰ نمونه ی باقیمانده(۲۱٪) استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین(MSSA) بودند(۱۴). حسینی و همکاران در بررسی مقایسه‌ای روش فنوتیپی سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و PCR ژن mecA نشان دادند که روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی می‌تواند حساسیتی هم‌ارز PCR داشته باشد؛ اما نتایج روش دیسک دیفیوژن با استفاده از اگزاسیلین نشان داد که سویه‌های کمتری در مقایسه با روش سفوکسیتین و یا PCR قابل‌شناسایی هستند و این می‌تواند در نتیجه ی مقاومت هتروژنیسیته و یا دیگر مکانیسم‌های مقاومت از قبیل جایگزینی خودبه‌خودی آمینواسیدها در دومین ترانس پپتیداز، تولید بیش‌ازحد پنی‌سیلیناز که سبب هیدرولیز پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز می‌شوند، تولید القاگر متی‌سیلیناز کد شده توسط پلاسمید باشد. استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط به اگزاسیلین را(Borderline Oxacillin-Resistant S. aureus یا BORSA) می‌نامند. از نقطه‌نظر کلینیکی، تمایز ایزوله‌های *mecA*$^{+}$ از سویه‌ها BORSA حائز اهمیت می‌باشند؛ زیرا این سویه ها می‌توانند در پروسه ی درمان اختلال ایجاد کنند. بنابراین، شناسایی ژن *mecA* برای تمایز دقیق MRSA ضروری است و *mecA*-PCR می‌تواند به‌عنوان یک متد مناسب در آزمایشگاه‌های پزشکی معرفی گردد. این یافته‌ها با مطالعه‌ی پیش رو هم‌ارز می‌باشند(۱۵). در یک مطالعه ی متاآنالیز و مروری نظام‌مند انجام‌شده، عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲، با تأکید بر اپیدمیولوژی MRSA در ایران از بین ۷۴۶۴ مقاله ی استخراج‌شده از پایگاه‌های اطلاعاتی، نشان دادند که ۲۶۹۰ سویه استافیلوکوک طلایی نشان داد که ۴/۷٪+۵۲/۷٪(بافاصله اطمینان ۹۵٪) از سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند. فراوانی نسبی MRSA در مطالعات مختلف بین ۲۰/۴۸٪ در اصفهان تا ۹۰٪ در تهران متغیر بود(۱۶). در سال ۲۰۰۵ Ruzickova و همکاران مجموعه‌ای از ۱۱۵ نمونه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در ۱۴ بیمارستان را بررسی کردند، که ۵۹ تیپ ET مثبت و ۴۰ سویه مسبب اپیدرمولایزیس نوزادان بودند که در ۴ تایپ PCR قرار می‌گرفتند(۳). رمضان زاده و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کردستان فرکانس ژن‌های *tst* و *eta* را به ترتیب ۸۱٪ و ۴۷٪ اعلام نمودند. همچنین فرکانس گونه‌های با هر دو

ژن ذکرشده ۴۰٪ بود(۱۷). Xie و همکاران پروفایلی از ژن‌های SE، ۳ ژن اکسفولیاتیو (*etc*، *etb*، *eta*) و ژن *tsst* را در ۱۰۸ استافیلوکوکوس اورئوس مشخص نمودند. این محققان نشان دادند که ۹۸ ایزوله، حاوی حداقل یکی از ژن‌های توکسین بود که ۴۸/۱٪(حاوی ژن *tsst*) و ۴۴/۴٪(*sea*) بودند. ژن‌های *sec* و *etb* در هیچ‌یک از ایزوله‌ها یافت نشد(۴). در سال ۲۰۱۸، Santosaningsih و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که از میان ۲۵۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از عفونت‌های پوست و بافت نرم، ۳/۱٪ از آن‌ها MRSA بودند. این محققان نشان دادند که فراوانی ژن et در ایزوله‌های MSSA برابر ۱۷/۵٪ بود(۱۸). همچنین Klibi و همکاران در تانزانیا و در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که از ۳۰۰ نمونه شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ماستیت، ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا نمودند که این میان آن‌ها تنها ۳ سویه حامل ژن *mecA* بودند. همچنین ۴ ایزوله MSSA حامل ژن *tsst* بودند(۱۹). اختلاف مشاهده شده با مطالعه کنونی می‌تواند در نتیجه تفاوت در نوع نمونه‌های تحت بررسی و مسافت جغرافیایی باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر نشان‌دهنده‌ی افزایش شیوع مقاومت در بین سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس است. این امر می‌تواند یک هشدار جدی برای درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان مورد مطالعه و تغییر رویکرد درمانی باشد. همچنین پیشنهاد می‌گردد تا جهت شناسایی سویه‌های MRSA، از دیسک سفوکسیتین(در برابر اگزاسیلین) و یا PCR برای ژن *mecA* استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله تمامی نویسندگان مقاله از کلیه پرسنل محترم بخش میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL & Jernigan DB. Methicillin-resistant-staphylococcus aureus hospitalizations, United States. Emerging Infectious Diseases 2005; 11(6): 868-72.

2. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) strain st 398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. Available at: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004258. 2009.

3. Ruzickova V, Voller J, Pantůcek R, Petras P & Doskar J. Multiplex pcr for detection of three exfoliative toxin serotype genes in staphylococcus aureus. Folia Microbiologica 2005; 50(6): 499-502.

4. Xie Y, He Y, Gehring A, Hu Y, Li Q & Tu SI. Genotypes and toxin gene profiles of staphylococcus aureus clinical isolates from China. Available at: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028 276. 2011.

5. Todd JK. Staphylococcal toxin syndromes. Annual Review of Medicine 1985; 36(1): 337-47.

6. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant staphylococcus aureus. Lancet 2001; 357(9264): 1225-40.

7. Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC, et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) in patients admitted to an urban hospital: Emergence of community-associated mrsa nasal carriage. Clinical Infectious Diseases 2005; 41(2): 159-66.

8. Cesur S & Cokça F. Nasal carriage of methicillin-resistant staphylococcus aureus among hospital staff and outpatients. Infection Control and Hospital Epidemiology 2004; 25(2): 169-71.

9. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E & Cauda R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) isolation? A systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61(1): 26-38.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 13th edition. Availableat: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/. 2014.

11. Deotale V, Mendiratta D, Raut U & Narang P. Inducible clindamycin resistance in staphylococcus aureus isolated from clinical samples. Indian Journal of Medical Microbiology 2010; 28(1): 117-24.

12. Shokri R, Salouti M, Sorouri Zanjani R & Heidari Z. Frequency of meticillin resistant staphylococcus aureus strains isolated from clinical samples in Mousavi hospital, Zanjan, and recognition mec a gene using pcr. Journal of Microbial World 2014; 7(18): 58-65[Article in Persian].

13. Onanuga A & Oghenekparobo Awhowho G. Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus strains from patients with urinary tract infections in Yenagoa. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 2012; 4(3): 226-30.

14. Razin B, Shabani M, Nabavi M, Taghavi N, Haghighi M & Foroumand M. Prevalence of methicillin-resistance-staphylococcus-aureus in different wards of Imam Hossein hospital in Tehran, in 2007-2008. Pajouhandeh 2010; 14(5): 263-7 [Article in Persian].

15. Hoseini SS, Niakan M, Saderi H & Eini ME. Comparison of cefoxitin disk diffusion and pcr for meca gene methods for detection of methicillin resistant staphylococcus aureus. Daneshvar Medicine 2015; 22(114): 41-6[Article in Persian].

16. Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A & Naderinasab M. Epidemiology of meca-methicillin resistant staphylococcus aureus (mrsa) in Iran: A systematic review and meta-analysis. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2012; 15(5): 1010-9.

17. Ramazanzadeh R, Salimizand H, Shahbazi B, Khonshah M & Narenji H. Prevalence of meca gene of methicillin resistant staphylococcus spp. Isolated from nosocomial infections and environmental specimens in Sanandaj hospitals, Kurdistan, Iran. Research in Molecular Medicine 2015; 3(3): 38-42.

18. Santosaningsih D, Santoso S, Setijowati N, Rasyid HA, Budayanti NS, Suata K, et al. Prevalence and characterisation of Staphylococcus aureus causing community-acquired skin and soft tissue infections on Java and Bali, Indonesia. Tropical Medicine & International Health 2018; 23(1): 34-44.

19. Klibi A, Jouini A, Gómez P, Slimene K, Ceballos S, Torres C, et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-resistant and-susceptible Staphylococcus aureus isolates of milk of cows with clinical mastitis in Tunisia. Microbial Drug Resistance 2018; DOI: 10.1089/mdr.2017.0278.

Detection of Virulence (*etA*, *etB* and *tst*) and Antibiotic Resistance (*mecA*) Genes in Staphylococcus Aureus Strains Isolated from Clinical Samples Using Multiplex-PCR Method

Mohammad Jani Fatemeh[1] (M.S.) - Amini Kumarss[2] (Ph.D.)

1 Master of Science in Microbiology, Microbiology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

2 Assistant Professor, Microbiology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

Abstract

Received: Jun 2017

Accepted: Nov 2017

Background and Aim: *Staphylococcus aureus* produces many virulence factors, including toxins, immune-modulatory factors, and exoenzymes. The study was performed to determine virulence and resistance-related factors *etA*, *etB*, *tst*, *mecA* and *femA* in the *S. aureus* isolated from clinical samples using Multiplex PCR.

Materials and Methods: In this cross - sectional study, a total 60 *S. aureus* were collected from the Shariati hospital in Tehran, Iran. Susceptibility test to several antimicrobial agents was performed by disk diffusion agar based on clinical and laboratory standard institute guidelines. After DNA extraction, the multiplex-PCR amplification of the *etA*, *etB*, *tst*, *mecA* and *femA* was performed in all the clinical isolates.

Results: In this study, all isolates (100%) were positive for the presence of femA gene. The highest and lowest resistance rate were related to erythromycin and cefoxitin, respectively. 33.3% (n; 20) and 43.3% (n; 26) of isolates carried in order etb and tst genes. All strains were negative for the eta gene.

Conclusion: Our results showed that, among many virulence factors produced by *S. aureus*, *etb*, *tst* play an important role in the pathogenesis of staphylococcal infections. Results suggested that identification of MRSA strains to be done using cefoxitin disk (in comparison of oxacillin) or PCR for *mecA* gene.

Keywords: S. Aureus, Virulence, Resistance, Multiplex PCR

*** Corresponding Author:**
Amini K;
Email:
dr_kumarss_amini@yahoo.com