

شناسایی ژن‌های بیماری‌زا (*etA*، *B* و *tst*) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی (*mecA*) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR

فاطمه محمد جانی^۱، دکتر کیومرث امینی^۲

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس فاکتورهای ویروالانس متعددی از قبیل توکسین‌ها، فاکتورهای تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی و آگزوانزیم‌ها را تولید می‌کند. این مطالعه به منظور شناسایی فاکتورهای مرتبط با ویروالانس و مقاومت (*etA*، *etB*، *tst*، *mecA* و *femA*) در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش Multiplex PCR انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه ی توصیفی- مقطعی، در مجموع 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 Multiplex-PCR، DNA به منظور تکثیر *etA*، *etB*، *tst*، *mecA* و *femA* بر روی تمامی ایزوله‌های کلینیکی انجام شد.

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

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که در میان فاکتورهای زیاد تولید شده 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 آگزاسیلین) و یا PCR برای ژن *mecA* انجام شود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های بیماری‌زا و مقاومت، Multiplex PCR

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

^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

فلسی شدن 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 متی‌سیلین 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 PBP2a با ژن *mecA* کدگذاری می‌گردد و با کاست ژنی SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) منتقل می‌شود و در کروموزوم سویه‌های مقاوم قرار دارد. در حال حاضر مقاومت دارویی در بین استافیلوکوک‌ها باعث بروز مشکلات زیادی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری شده است (۹).

بنابر اهمیت موضوع مقاومت‌های 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 *eta*، *etb*، *tst*، *femA*، *mecA* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه که به صورت 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 برونکوالوئولار

استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت به‌طور معمول از پوست و بینی افراد سالم جدا می‌شود. این باکتری یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب است که می‌تواند در سطوح مختلفی از جمله سطح بدن کلونیزه شود و به علت فاکتورهای ویروالانس 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 سویه‌ها سوپراآنتی ژن‌های 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 از جمله زرد زخم تاولی، سندرم فلسی شدن پوست استافیلوکوکی (Scalded skin syndrome)، سندرم رایتز و سندرم شوک توکسیک (TST) به‌ویژه در کودکان و افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند، می‌شود (۲). توکسین‌های اکسفولیاتیو که آن‌ها را اپیدرمولایتیک توکسین نیز می‌نامند، توسط ژن *et* کد می‌شوند که دارای سه ایزوفرم (A/B/D) می‌باشند که ژن *eta* کدکننده‌ی اکسفولیاتیو توکسین نوع A و بر روی یک پروفاژ، *etb* کدکننده‌ی توکسین ETB و بر روی یک پلاسمید بزرگ قرار دارند و ژن *etd* نیز محدود به جزایر بیماری‌زایی است. شایع‌ترین توکسین اکسفولیاتیو جدا شده از انسانی، ایزوفرم‌های *ETA* و *ETB* هستند. توکسین‌های اکسفولیاتیو سرین پروتئازهایی با ویژگی سوبسترای بالاهستند که قدرت تشخیص انتخابی و هیدرولیز پروتئین‌های دسموزومال را دارند (۳ و ۴). سندرم شوک توکسیک یک بیماری سیستمیک است که اولین بار توسط Todd معرفی شد (۵). سه تیپ مختلف از توکسین TSST-1 به نام‌های 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 جدا شده از افراد سالم نیز دیده شده است (۶). سندرم شوک سمی با رهاسازی توکسین به جریان خون آغاز می‌شود و در مرحله‌ی اول بیماری علائمی مانند: تب بالا، راش ماکولار گسترده، تهوع، استفراغ، اسهال، میالژی، گلودرد و سردرد، پرخونی حلق و افت فشارخون دیده می‌شود. در مرحله‌ی دوم علائم شدیدتر شده و با میوکاردیت، ایجاد اختلال در عملکرد کلیه‌ها، ادم، اختلال تنفسی،

گردید و به صورت مقاوم (Resistant (R)، نیمه حساس (Intermediate (I) و حساس (Sensitive (S) گزارش شد.

به منظور تکثیر ژن‌های *femA* و *mecA*، *tst*، *etb*، *eta* ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده ($OD_{260/280}=1.8-2nm$) از دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر ترمو (Therm) (سوئد) استفاده شد. از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرهایی از قبل موجود و فهرست شده در جدول یک استفاده شد (جدول ۱) (۴). پس از BLAST پرایمرهای انتخاب شده 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، (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، طولیل شدن (extension) ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶ دقیقه انجام شد. در این مطالعه از سویه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت و اشریشیا کلی ATCC25922 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

(BAL) (۵ ایزوله؛ ۸/۳٪)، تراشه (۴ ایزوله؛ ۶/۶٪) و ادرار (۴ ایزوله؛ ۶/۶٪) جمع‌آوری گردید. پس از انتقال سویه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار (شرکت مرک، کشور آلمان) به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ایزولاسیون و شناسایی سویه‌ها بر اساس تست‌های استاندارد شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، رشد در مانیتول سالت آگار و DNase انجام شد. به منظور حفظ نمونه‌های تأیید شده، 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 هیتون آگار (مرک، آلمان) و با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های (تهیه شده از شرکت Mast، انگلیس)؛ آمپی‌سیلین (۳۰۰ μg)، جنتامایسین (۳۰ μg) آموکسی کلاو (۲۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، اریترومایسین (۵ μg)، آگازاسیلین (۵ μg) و سفوکسیتین (۳۰ μg) بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (۱۰) انجام شد. واکنش حساسیت آنتی‌بیوتیکی 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 هیتون آگار انجام گردید. سوسپانسیون تهیه شده به وسیله‌ی سوآپ استریل پنبه‌ای روی محیط مولر هیتون آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند و محیط کشت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. بعد از آن قطر هاله‌ی عدم رشد به وسیله‌ی خط کش اندازه گرفته شد و با استانداردهای جهانی (CLCI) مقایسه

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	توالی الیگونوکلئوتیدی (3' → 5')	طول قطعه‌ی آمپلیکون (bp)
<i>fem-A</i>	F=5'- TTACAGAGTAACTGTTACC-3' R=5' - ATACAAATCCAGCAGCTCT-3'	۶۵۱
<i>mecA</i>	F=5' -ACTGCTATCCACCCTCAAAC-3' R=5'-CTGGTGAAGTTGTAATCTGG-3'	۱۶۳
<i>eta</i>	F=5'-GCAGGTGTTGATTTAGCATT-3' R=5' -AGATGTCCTATTTTTGCTG-3'	۹۳
<i>etb</i>	F=5'-ACAAGCAAAAAGAATACAGCG-3' R=5'-GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG -3'	۲۲۶
<i>tst</i>	F=5'-ACCCCTGTTCCCTTATCATC-3' R=5'-TTTTCAGTATTTGTAACGCC-3'	۳۲۶

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

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

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 مطالعه‌ی حاضر نشان داد که از ۶۰ سویه‌ی مورد بررسی، ۲۱ ایزوله (۳۵٪) دارای مقاومت به دیسک سفوکسیتین بودند و در نتیجه به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در نظر گرفته شدند.

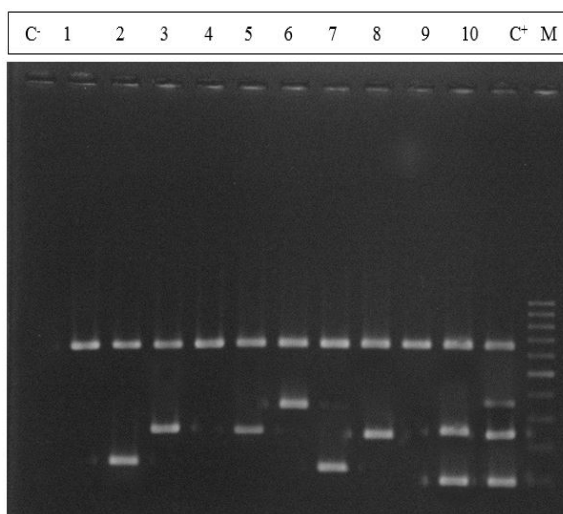
نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب متعلق به اریترومایسین (۸۵٪) و سفوکسیتین (۳۵٪) بود. نتایج تست انتشار از ژل در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که از ۶۰ سویه‌ی مورد بررسی، ۲۱ ایزوله (۳۵٪) دارای مقاومت به دیسک سفوکسیتین بودند و در نتیجه به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به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

جدول ۳: فراوانی ژن‌های مورد مطالعه

سویه‌ی مورد مطالعه	ژن‌های مورد مطالعه					تعداد نمونه
	<i>eta</i>	<i>femA</i>	<i>mecA</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	
استافیلوکوکوس اورئوس	۰ (۰/۰٪)	۶۰ (۱۰۰٪)	۲۱ (۳۵٪)	۲۰ (۳۳/۳٪)	۲۶ (۴۳/۳٪)	۶۰

در مطالعه‌ی فوق تمامی ۶۰ نمونه (۱۰۰٪) از نظر وجود ژن *femA* مثبت بودند و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به‌دست آمده 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 مطالعه‌ی پیش رو ژن انتروتوکسین *a* در هیچ‌کدام از سویه‌ها یافت نشد. همچنین ۲۱ ایزوله از نظر 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.

در مطالعه‌ی فوق تمامی ۶۰ نمونه (۱۰۰٪) از نظر وجود ژن *femA* مثبت بودند و به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به‌دست آمده 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 مطالعه‌ی پیش رو ژن انتروتوکسین *a* در هیچ‌کدام از سویه‌ها یافت نشد. همچنین ۲۱ ایزوله از نظر 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.



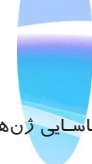
شکل ۱: ممبرول PCR-M بر روی ژل آگار (ز، به ترتیب از چپ به راست، کنترل منفی (اشرشیا کلی ATCC25922)، چاهک‌های ۱۰-۱؛ ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس. کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923): M، نشانگر ۱۰۰ bp (100 bp DNA Ladder)، قطعات 651 bp، 163 bp، 226 bp و 326 bp به ترتیب مربوط به ژن‌های *femA*،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

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن شایع در جهان است که به عنوان دومین باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، سویه‌های خاصی از این باکتری هستند که به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله متی‌سیلین مقاوم می‌باشند. سویه‌هایی از MRSA که بیشتر در بیمارستان‌ها دیده شد به نام (Healthcare-Acquired Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) HA-MRSA یا به اصطلاح، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان می‌گویند. اما در حال حاضر، سویه‌های استافیلوکوکوس 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 مطالعه‌ی فوق تمامی ۶۰ نمونه (۱۰۰٪) از نظر وجود ژن *femA* مثبت بودند و به عنوان استاف اورئوس در نظر گرفته شدند. با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۶۰ نمونه بالینی، کمترین و بیشترین تعداد نمونه مربوط به ژن *eta* با تعداد ۰ نمونه (۰٪) و ژن *tst* در ۲۶ ایزوله (۴۳٪) از نمونه‌ها شناسایی گردید. همچنین ۲۱ ایزوله از نظر وجود قطعه ژنی *mecA* مثبت بودند و به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در نظر گرفته شدند. شکر و همکارانشان در سال ۱۳۹۳ با بررسی ۱۷۶ نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان آیت ... موسوی زینجان، نشان دادند که فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس (۴۵٪/۲۵/۵ 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 مشاهده شده در مطالعات فوق‌الذکر با مطالعه پیش رو می‌تواند در نوع نمونه، تعداد نمونه و فاصله‌ی جغرافیایی باشد. نتیجه‌ی 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 نمونه‌ی بررسی شده در مطالعه‌ی رازین و همکاران، تعداد ۱۴۳ (۲/۱٪) استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد که ۱۱۳ نمونه (۷۹٪) MRSA و ۳۰ نمونه‌ی باقیمانده (۲۱٪) استافیلوکوکوس 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 نتیجه‌ی مقاومت هتروژنیسته و یا دیگر مکانیسم‌های مقاومت از قبیل جایگزینی خودبه‌خودی آمینواسیدها در دومین ترانس‌پپتیداز، تولید بیش از حد 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 سویه‌ها می‌توانند در پروسه‌ی درمان اختلال ایجاد کنند. بنابراین، شناسایی ژن *mecA* برای تمایز دقیق MRSA ضروری است و *mecA*-PCR می‌تواند به عنوان یک متد مناسب در آزمایشگاه‌های پزشکی معرفی گردد. این یافته‌ها با مطالعه‌ی پیش رو هم‌ارز می‌باشند (۱۵). در یک مطالعه‌ی متاآنالیز و مروری نظام‌مند انجام شده، عسگری و همکاران در سال ۲۰۱۲، با تأکید بر اپیدمیولوژی MRSA در ایران از بین ۷۴۶۴ مقاله‌ی استخراج شده از پایگاه‌های اطلاعاتی، نشان دادند که ۲۶۹۰ سویه استافیلوکوکوس طلائی نشان داد که ۴/۷٪/۵۲/۷+ (با فاصله 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



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.

ژن ذکر شده ۴۰٪ بود (۱۷). Xie و همکاران پروفایلی از ژن‌های SE، ۳ ژن اکسفولیاتیو (*eta*, *etb*, *etc*) 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 مطالعه‌ی نشان دادند که از میان ۲۵۷ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های پوست و بافت نرم، ۳/۱٪ از آن‌ها MRSA بودند. این محققان نشان دادند که فراوانی ژن *et* در ایزوله‌های MSA 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 MSA حامل ژن *tsst* بودند (۱۹). اختلاف مشاهده شده با مطالعه کنونی می‌تواند در نتیجه تفاوت در نوع نمونه‌های تحت بررسی و مسافت جغرافیایی باشد.

منابع

- 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.
- 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.
- Ruzickova V, Voller J, Pantůček 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.
- 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.0028276>. 2011.
- Todd JK. Staphylococcal toxin syndromes. *Annual Review of Medicine* 1985; 36(1): 337-47.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Lancet* 2001; 357(9264): 1225-40.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 13th edition. Available at: <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 Fatemeh¹ (M.S.) - Amini Kumarss² (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