تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز

زیبا شانکی باورصاد[۱*]، مریم رئیسی[۱]، مرضیه سلیمانیان[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- ۱-دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

نویسنده مسئول: zibashanaki91@gmail.com

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های کسب شده از بیمارستان‌ها و اجتماع می‌باشد. ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ مترشحه از این باکتری، از دسته فاکتورهای ویرولانس بسیار مهم و جزء سوپر آنتی‌ژن‌های توکسین پیروژنیک می‌باشد. هدف از این مطالعه، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز می‌باشد. در این تحقیق ۱۳۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه های مختلف بیمارستانی به منظور تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی فراوانی ژن *tsst-1* مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA تشخیص قطعی باکتری انجام شد سپس فراوانی ژن *tsst-1* در حضور پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن آگار تعیین شد. پس از انجام آزمون PCR و تشخیص قطعی باکتری، از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی توالی ژن *tsst-1* در ۶ ایزوله مشاهده گردید. در تست آنتی‌بیوگرام بیشترین مقاومت نسبت به سفازولین (۸۳/۳٪) و کمترین مقاومت نسبت به نیتروفورانتیئن و وانکومایسین (۰٪) مشاهده گردید. با توجه به افزایش شیوع مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها واهمیت بالینی ژن *tsst-1* شناسایی به موقع و به کارگیری راه کارهای مناسب درمانی درکنترل عفونت امری ضروری به نظر می‌رسد.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، توکسین سندروم شوک توکسیک-۱، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس به طور مداوم یکی از چهار عامل عفونت‌های بیمارستانی (همراه با *شریشیا کلی*، *انتروکوکوس فکالیس* و *پسودوموناس آئروژینوزا*) می باشد. تاکنون *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین(MRSA) محدود به بیمارستان بوده ولی به واسطه افزایش عفونت‌های پوست و بافت‌های نرم و پنومونی نکروز دهنده در بیماران جوانتر، استافیلوکوک‌های مقاوم به متی سیلین در جامعه (CA-MRSA) در سراسر دنیا گسترش یافت. اگرچه *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از اعضاء فلور نرمال بینی و روده در ۵۰-۳۰٪ از جمعیت جامعه می باشد، اما این ارگانیسم در ۹۰٪ از کارکنان بالینی بیمارستان‌ها حمل می شود. این باکتری به طور غیرمعمول نسبت به خشکی مقاوم است، به طوری که سریعاً و به آسانی از طریق دست‌های پرسنل درمانی و از طریق وسایلی مثل لباس‌ها، ملحفه ها و دستگاه ها به بیماران انتقال پیدا

می‌کنند. گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور تیپیک نسبت به تعداد زیادی از داروها مقاومند و قادرند از مرگ به وسیله اکثر ضد عفونی کننده ها فرار نمایند. لذا این باکتری‌ها قادر به پایداری و رشد مناسب در محیط بیمارستان هستند و در نتیجه می‌توانند به اشخاصی که حساسیت بالایی به عفونت‌های استافیلوکوکی دارند مانند نوزادان تازه به دنیا آمده، بیماری دارای ضعف ایمنی، سوختگی‌ها و بیماران دارای وسایلی مثل کاتتر منتقل شوند (۲، ۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی از جمله ژن *tsst-1* است که منجر به کلونیزاسیون و بیماری‌زایی باکتری می‌شود (۴، ۳). این توکسین یک پروتئین ۲۴ کیلودالتونی است که اساساً به وسیله استافیلوکوکوس هایی تولید می‌شود که نسبت به یک یا دو باکتریوفاژ اختصاصی (باکتریوفاژهای ۵۲ و ۲۹ و یا هر دو) حساس هستند و دارای مقاومت کروموزومی نسبت به کادمیوم، آرسنات و پنی سیلین G را نشان می دهند. *TSST-1* یک سوپر آنتی ژن است که باعث بیان انتخابی رده هایی از سلول‌های T همراه با ازدیاد ترشح سایتوکین‌ها، مونوکاین‌ها و اوتاکوئیدها می‌گردند. این توکسین همچنین منجر به نشت وسیع مویرگ‌ها می‌شود که منجر به کاهش حجم خون شده و مستقیماً برای میوکارد، کلیه ها، کبد، ریه ها، بافت های لنفوئیدی، CNS و اعصاب محیطی توکسیک می‌باشد (۱). این سم با اتصال هم زمان به ناحیه Vβ در پذیرنده آنتی ژنی لنفوسیت‌های T و مولکول‌های MHC کلاس II فعالیت خود را انجام می‌دهد و منجر به فعال شدن ۳۰-۵ ٪ همه لنفوسیت های T یاریگر بیان کننده CD4 می شود (۵). فاکتورهای مناسب برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده TSST-1 عبارتند از وجود اکسیژن، pH خنثی، میزان پروتئین بالا، گلوکز کم، منیزیم پایین تا نرمال و دی کسید کربن زیاد در محیط های آزمایشگاهی، این شرایط به طور قابل توجهی موجب افزایش تولید TSST-1 و پروتئاز می شود (۶). این مطالعه با هدف تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و توزیع فراوانی ژن توکسین سندرم شوک توکسیک-۱ در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد کلینیکی بیمارستان امام خمینی اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت.

مواد و روش ها

۱. نمونه گیری و جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه به منظور تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* تعداد ۱۳۳ نمونه کلینیکی از قبیل مایع شکمی(آسیت) (۳ نمونه)، آبسه (۷ نمونه)، خون (۲۷ نمونه)، کاتتر (۴ نمونه)، مایع دیالیز (۱ نمونه)، چشم(ملتحمه، قرنیه، جسم خارجی مانند لنز) (۸ نمونه)، مایع مفصل (۴ نمونه)، بینی (۲ نمونه)، مایع پریکارد (۱ نمونه)، مایع پلور (۲ نمونه)، زخم بستر (۱ نمونه)، ترشح چرکی (۱ نمونه)، مایع نخاع (۱ نمونه)، پوست (۴۸ نمونه)، زخم جراحی (۱۶ نمونه)، تراشه (۱ نمونه)، ادرار (۵ نمونه) و زخم استرنال (عمل قلب) (۱ نمونه) مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمان شهرستان اهواز صورت گرفت.

۲. آزمایش آنتی بیوگرام

ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کربی- بائر (دیسک دیفیوژن آگار) بر اساس رهنمودهای CLSI (پادتن طب) انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل آمیکاسین (۳۰ µg)، سفازولین (۳۰ µg)، سفکسیم (۵ µg)، سفوکسیتین (۳۰ µg) (شرکت ROSCO، دانمارک)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، کلیندامایسین (۲ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، نیتروفورانتئین (۳۰۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، کوتریموکسازول (۲۵ µg)، وانکومایسین (۳۰ µg) (پادتن طب، ایران) بود (۷، ۸).

۳. آزمایشات مولکولی

به منظور تائید قطعی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* ردیابی ژن *aroA* در ایزوله ها، از واکنش زنجیره ای

پلیمراز استفاده شد (۹). در این تحقیق از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این راستا ابتدا DNA ژنومی باکتری های رشد یافته در محیط BHI با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران)، استخراج و در دو مرحله آزمایش PCR روی DNA تخلیص شده انجام گرفت:

در مرحله اول حضور قطعی *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایزوله ها با ردیابی ژن *aroA* با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام گرفت. در این مرحله واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه تنظیم و با برنامه حرارتی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مستر سایکلر گرادیانت (اپندرف، آلمان) انجام گرفت.

در مرحله دوم به منظور شناسایی ژن *tsst-1* در *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به شرح زیر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرومول dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرهای R و F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه ۶۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن های *aroA* و *tsst1* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اوررئوس*

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه (جفت باز)
aroA	FA1AGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC RA2 CACAAGCAACTGCAAGCAT	۱۱۵۳ bp
tsst1	TSST-1 ATGGCAGCATCAGCTTGATA TSST-2 TTTCCAATAACCACCCGTTT	۳۵۰bp

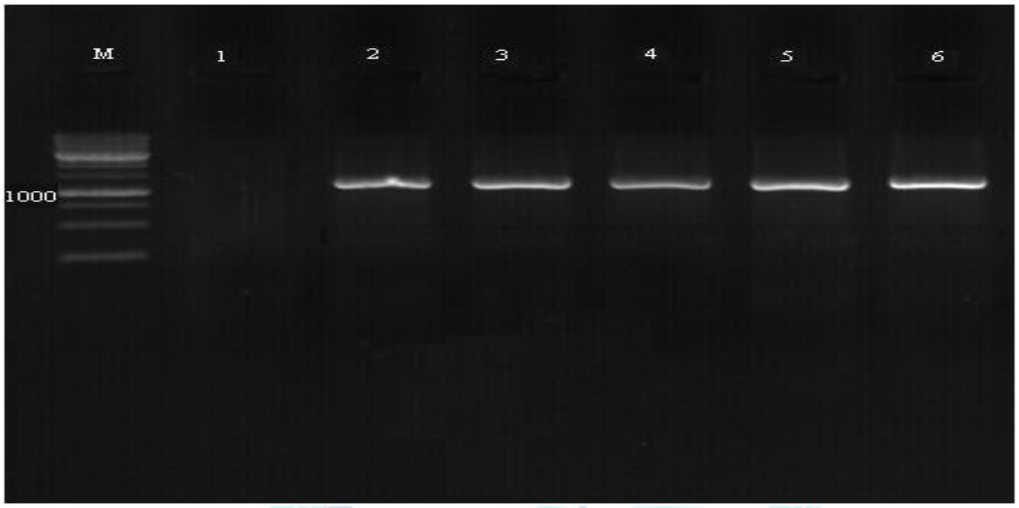
نتایج

بعد از انجام آزمایشات PCR، محصول PCR روی ژل ۱٪ آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) الکتروفورز و نتیجه با دستگاه تصویر بردار از ژل (انگلستان، Uviteck) مورد بررسی قرار گرفت.

۴. آنالیز آماری

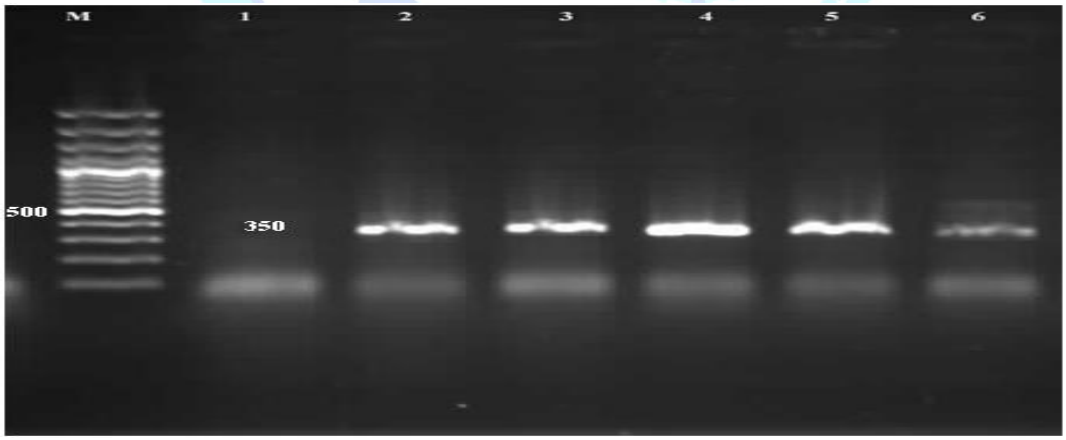
نتایج حاصل از ارزیابی ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از آزمون مربع کای اسکوار و دقیق فیشر و نرم افزار آماری SPSS شماره ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و حضور توالی ژن *aroA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۱۵۳ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.



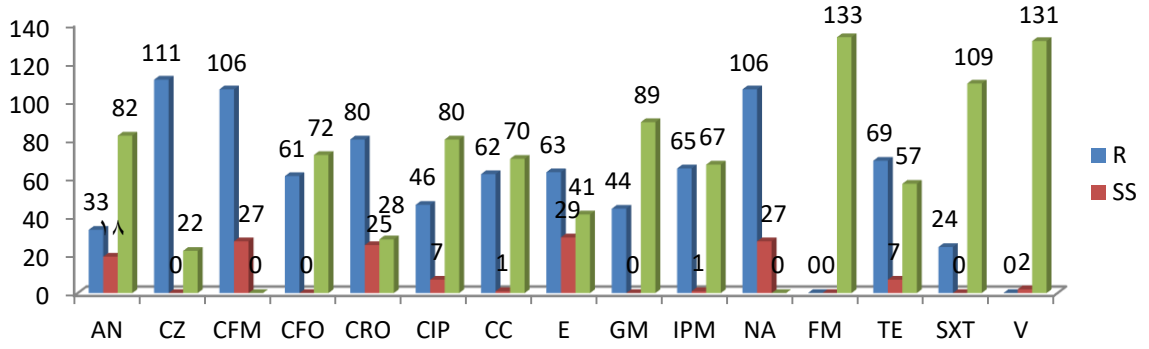
تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *aroA*/*استافیلوکوکوس اورئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت، ستون های ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه های مثبت واجد باند ۱۱۵۳ جفت بازی

با انجام آزمون PCR به منظور ردیابی ژن *tsst-1* از ۱۳۳ ایزوله مورد بررسی در ۶ ایزوله توالی ژن *tsst-1* مشاهده گردید. مشاهده باند ۳۵۰ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن این تست می باشد. نتایج در شکل (۲) نشان داده شده است.



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *tsst-1*/*استافیلوکوکوس اورئوس*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون ۱ کنترل منفی، ستون های ۲، ۳، ۴، ۵ نمونه های مثبت

پس از تائید باکتری با استفاده از آزمون‌های میکروبیولوژی و مولکولی، بیشترین مقاومت باکتری های ایزوله شده نسبت به سفتریاکسون (۶۰/۱۵٪) و کمترین مقاومت نسبت به وانکومایسین و نیتروفورانتیئن (۰٪) مشاهده شد. نتایج در نمودار (۱) نشان داده شده است.



نمودار ۱: فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

در این تحقیق از ۱۳۳ نمونه مورد بررسی ۷۶ نمونه متعلق به جنس زن (۵۷ ٪) و ۵۷ نمونه متعلق به جنس مرد (۴۳ ٪) می‌باشد. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر حسب جنسیت در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول ۲: میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب جنسیت

آنتی بیوتیک	جنسیت						p-value
	زن ۷۶n=			مرد ۵۷n=			
	R	I	S	R	I	S	
آمیکاسین(AN)	(٪۳۲/۸)۲۵	(٪۱۰/۹)۸	(٪۵۶/۲)۴۳	(٪۱۳/۲)۷	(٪۸/۶۱)۹	(٪۷۱/۷)۴۱	*۰/۰۲۲
سفازولین(CZ)	(٪۵۰)۳۸	۰	(٪۵۰)۳۸	(٪۱۰۰)۵۷	۰	۰	*۰/۸۷۶
سفکسیم(CFM)	(٪۷۵)۵۷	(٪۲۵)۱۹	۰	(٪۱۰۰)۵۷	۰	۰	*۰/۰۰۰
سفوکسیتین= متی سیلین (CFO)	(٪۵۲/۴)۴۰	۰	(٪۴۷/۶)۳۶	(٪۳۵/۸)۲۰	۰	(٪۶۴/۲)۳۷	*۰/۰۴۴
سفتزیاکسون (CRO)	(٪۶۵/۲)۵۰	(٪۱۲/۱)۹	(٪۲۲/۷)۱۷	(٪۵۳/۸)۳۱	(٪۲۶/۹)۱۵	(٪۱۹/۲)۱۱	*۰/۰۹۹
سیپروفلوکساسین (CP)	(٪۳۷/۹)۲۹	(٪۴/۵)۳	(٪۵۷/۶)۴۴	(٪۲۷/۸)۱۶	(٪۷/۴)۴	(٪۶۴/۸)۳۷	*۰/۴۱۲
کلیندامایسین (CC)	(٪۵۰/۸)۳۹	۰	(٪۴۹/۲)۳۷	(٪۳۹/۶)۲۳	(٪۱/۹)۱	(٪۵۸/۵)۳۳	*۰/۲۹۲
اریترومایسین (E)	(٪۴۷/۷)۳۶	(٪۲۱/۵)۱۶	(٪۳۰/۸)۲۴	(٪۴۳/۴)۲۵	(٪۲۴/۵)۱۴	(٪۳۲/۱)۱۸	*۰/۸۷۶
جنتامایسین(GM)	(٪۲۰)۱۵	۰	(٪۸۰)۶۱	(٪۱۰۰)۵۷	۰	۰	*۰/۰۰۰
ایمی پنم (IPM)	(٪۵۴/۷)۴۲	۰	(٪۴۵/۳)۳۴	(٪۳۸/۹)۲۲	(٪۱/۹)۱	(٪۵۹/۳)۳۴	*۰/۰۸۹
نالیدیکسیک اسید (NA)	(٪۷۵)۵۷	(٪۲۵)۱۹	۰	(٪۱۰۰)۵۷	۰	۰	*۰/۰۰۰
نیتروفورانتیئن (FM)	۰	۰	(٪۱۰۰)۷۶	۰	۰	(٪۱۰۰)۵۷	-
تتراسیکلین (TE)	(٪۵۰)۳۸	۰	(٪۵۰)۳۸	(٪۵۳/۶)۳۱	(٪۱۰/۷)۶	(٪۳۵/۷)۲۰	*۰/۰۸۶
کوتریموکسازول (SXT)	(٪۲۱/۷)۱۶	۰	(٪۷۸/۳)۶۰	(٪۱۵/۴)۹	۰	(٪۸۴/۶)۴۸	*۰/۴۴۲
ونکومایسین (V)	۰	(٪۱/۵)۱	(٪۹۸/۵)۷۵	۰	(٪۱/۹)۱	(٪۹۸/۱)۵۶	**۱/۰۰

در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو، بین جنسیت و آنتی بیوتیک های سفازولین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، اریترومایسین، ایمی پنم، تتراسیکلین و کوتریموکسازول

رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value> 0/05). اما بین جنسیت و آنتی‌بیوتیک‌های آمیکایسین، سفکسیم، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید رابطه آماری معنی داری مشاهده گردید (P-value< 0/05). همچنین با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آنتی‌بیوتیک وانکومایسین رابطه آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value> 0/05).

در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۱۰ ایزوله (۷/۵۱٪) DTest مثبت دیده شد (مقاومت القایی کلیندامایسین). نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. این پدیده به این صورت اتفاق می افتد که اگر در شرایط آزمایشگاهی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به کلیندامایسین حساس باشد ولی نسبت به اریترومایسن مقاوم باشد و این مقاومت را به کلیندامایسین القا کند به طوری که هاله عدم رشد به شکل حرف D مشخص شود، این پدیده را D می گویند و به صورت کلیندامایسین مقاوم و اریترومایسین مقاوم گزارش می‌شود (۱۰).

شکل ۳: پدیده D در *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (۴/۵۱٪) ژن *tsst-1* گزارش گردید. نتایج به تفکیک در جدول ۳-۴و شکل ۳-۵ نشان داده شده است.

جدول ۳: فراوانی ژن *tsst-1* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب جنسیت، نوع نمونه و مقاومت آنتی بیوتیکی

ردیف	جنسیت	سن	نوع نمونه	مقاومت آنتی بیوتیکی
۱	مرد	۵۴	ضایعات پوست	TE, CC, E
۲	مرد	۲۶	ضایعات پوست	CFO, CC, CRO, E, IMP, AN, CP
۳	مرد	۳۶	خون	TE
۴	زن	۱۷	خون	CFO
۵	زن	۴۷	ضایعات پوست	TE
۶	زن	۱۳	مایع مفصل	-

از ۶ ایزوله واجد ژن *tsst1*، ۳ ایزوله مربوط به جنسیت زن (۵۰٪) و ۳ ایزوله مربوط به جنسیت مرد (۵۰٪) بود که در جنسیت مرد ۲ ایزوله (۶۶/۶۶٪)از ضایعات پوست و ۱ ایزوله(۳۳/۳۳٪) از خون جدا شده بود. در صورتی‌که در جنسیت زن ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از خون، ۱ ایزوله(۳۳/۳۳٪) از ضایعات پوست و ۱ ایزوله (۳۳/۳۳٪) از مایع مفصل جدا شده بود.

از ۶ ایزوله واجد ژن *tsst1*، مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۳ ایزوله (۵۰٪)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین ومتی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳٪) و مقاومت نسبت به ایمی پنم، سفتریاکسون، اریترومایسین و آمیکایسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶٪) مشاهده گردید. درتجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و ژن*tsst1* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (p-value>0/05).

بحث و نتیجه گیری

افزایش مقاومت دارویی معضل بزرگی است وعلت اصلی پیدایش مقاومت، مصرف نامناسب و بی رویه آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد صرف نظر از الگوی مصرف آنتی بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی می‌توانند در ایجاد مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها نقش داشته باشند (۱۱). برای نخستین بار در سال ۱۹۶۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی معرفی شد (۱۲-۱۴). مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مختلف براساس الگوهای درمانی که درمناطق مختلف صورت می‌گیرد، متفاوت است. به عنوان مثال در مطالعه ما بیشترین مقاومت نسبت به سفتریاکسون (۶۰٪) و کمترین مقاومت نسبت به نیترو فورانتئین و وانکومایسین (۰٪) گزارش گردید است.

در مطالعه انجام شده توسط رئیسی و همکاران که بر روی ۶۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های فوقانی دستگاه تنفسی در سال ۱۳۹۳در شهرستان شهرکرد صورت گرفت، مقاومت نسبت به اریترومایسین ۵٪ و مقاومت نسبت به وانکومایسین ۵/۰٪ گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق ما متفاوت می باشد. در مطالعه دیگر که توسط رشیدیان و همکاران در بیمارستان بعثت سنندج انجام شد حساسیت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده را به اریترومایسین ۵۹ ٪ و در مطالعه انجام شده توسط قاسمیان و همکاران حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوکوس اوررئوس به وانکومایسین ۴/۴۴٪ برآورد گردید (۲، ۱۵، ۱۶). اختلافات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها می‌تواند ناشی از اختصاصات بومی هر منطقه، روش به کار رفته برای تعیین میزان حساسیت و عوامل دخیل در ایجاد مقاومت دارویی از جمله پلاسمیدهای قابل انتقال و غیره... باشد (۲).

در قسمت دیگر از این تحقیق به فراوانی ژن *tsst-1* در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداخته شد عامل اصلی ایجاد سندرم شوک توکسیک، ترشح توکسین TSST-1 ترشح شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. بروز این سندرم در ایالات متحده، در حدود ۰/۵ در صد هزار است. اغلب سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران مبتلا به شوک سمی جدا شده اند، سم ایجاد کننده شوک سمی (TSST-1) را تولید می-کنند که این توکسین موجب تب، کاهش فشار خون، علائم گرفتاری اندام های مختلف و بثورات پوستی می شود. در این تحقیق از ۱۳۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی تنها در ۶ ایزوله (۴/۵۱٪) ژن *tsst-1* گزارش گردید. مطالعات محققان دیگر تفاوت ها و تشابهاتی را با تحقیق ما نشان می‌دهد که در زیر به پاره ایی از تحقیقات انجام شده اشاره می‌کنیم.

با توجه به اهمیت بررسی وجود ژن*tsst1* ، جوهانسون در سال ۱۹۹۱ نشان داد که استفاده از روش PCR برای شناسایی این ژن نسبت به سایر روش‌ها مثل روش های ایمونولوژیک، روشی مناسب، حساس سریع و ارزان می-باشد (۱۷). تا کنون روش های متعددی برای شناسایی توکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده است. روش‌هایی که براساس واکنش‌های ایمونولوژی مانند الایزا طراحی شده اند، زمان بر و غیر اختصاصی بوده و اغلب با واکنش متقاطع نیز همراه می‌باشد. اما در روشPCR که اساس ان شناسایی ژن‌های تولید کننده توکسین است از سرعت، حساسیت و ویژگی قابل توجهی نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است. لذا اخیرا محققین از این روش جهت شناسایی ژن های کد کننده توکسین-های *استافیلوکوکی* استفاده می کنند (۱۹، ۱۸). در تحقیق انجام شده توسط درنبرگ و همکاران در ۲۰۰۵ که بر روی ۱۰۳ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز فراوانی ژن*tsst-1* در سویه های جدا شده از اجتماع، بیمارستان و بیماران گرانولوماتوز به ترتیب ۲۳/۵۲٪، ۱۳/۸۸٪ و

۱۴٪ گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار زیادتر می‌باشد(۲۰). در سال ۲۰۰۷، اسلام و همکاران، از ۳۰ *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت، یک سویه (۳/۳٪) واجد ژن *tsst-1* را شناسایی کردند که فراوانی این ژن نسبت به تحقیق ما کمتر می‌باشد (۲۱).

در مطالعه پارسونت و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۵۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زنان را مورد بررسی قرار دادند. ۱۴سویه (۸/۸٪) از نظر ژن ژن *tsst-1* مثبت گزارش شدند. که نسبت به تحقیق ما از فراوانی بیشتری برخوردار می‌باشد (۲۲). در مطالعه ای که تیهو و همکاران در ۱۳۹۰-۱۳۸۹ بر روی ۱۴۵۴ نمونه از بیماران بستری در بیمارستان انجام دادند ۲۰ ایزوله (۱/۳۷٪) از نظر ژن*tsst-1* مثبت گزارش شدند که ۱۵ایزوله (۷۵٪) دارای مقاومت نسبت به متی سیلین بودند. در مطالعه حاضر از ۶ ایزوله واجد ژن مورد نظر مقاومت نسبت به تتراسایکلین در ۴ ایزوله (۶/۶۶٪)، مقاومت نسبت به کلیندامایسین و سفوکسیتین- متی سیلین در ۲ ایزوله (۳۳/۳۳٪) و مقاومت نسبت به ایمی پنم، سفتریاکسون، اریترومایسین و آمیکایسین در ۱ ایزوله (۱۶/۶۶٪) مشاهده گردید (۴).

در تحقیق انجام شده توسط نوروزی و همکاران که با عنوان شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن انتروتوکسینA-E و *TSST-1* توسط روش PCR، فراوانی ژن *tsst-1* ۲۶/۴۱٪ گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر می‌باشد. در این تحقیق ۷۵/۴۷٪ ایزوله ها ژن های انتروتوکسین به همراه ژن*tsst-1* گزارش گردیدند (۲۳). در صورتی‌که در مطالعه بکر و همکاران در سال ۱۹۹۸ از ۵۰ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* تنها در ۱ ایزوله (۲ ٪) به طور مشترک ژن‌های *tsst-1* و *entC* گزارش گردید (۲۴). عموم افراد دارای آنتی بادی ضد توکسین TSST-1 می-باشند و به نظر می رسد این افراد نسبت به سایرین، خطر کمتری برای ابتلا به سندرم شوک توکسیک دارند. کودکان و افراد جوان به دلیل عدم مواجهه قبلی با توکسین و پایین بودن سطح آنتی بادی، خطر بالاتری برای ابتلا به این سندرم را دارند (۲۷-۲۵).

به طوری که در مطالعه ای که در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ با هدف تعیین تیتر آنتی بادی سرمی ضد توکسین TSST-1 در کودکان ژاپنی انجام شد، ۱۱۹ بیمار بستری در بخش جراحی پلاستیک و ترمیمی، تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گروه سنی ۷ ماهه تا دو ساله، دارای کمترین تیتر آنتی بادی بودند، به نحوی که میزان تیتر آنتی بادی در دو گروه ۷ تا ۱۲ ماهه و ۱۲ تا ۲۴ ماهه ۳۰/۸٪ و ۳۳/۳ ٪ گزارش شد. این دو گروه سنی دارای بیشترین موارد بستری به دلیل علائم بالینی بودند که این امر استعداد بالای ابتلا به سندرم شوک توکسیک را در این کودکان نشان می‌دهد. ۷۸/۶ ٪ کودکان با سن کمتر از شش ماه دارای تیتر مثبت آنتی بادی TSST-1بودند که بالاترین میزان تیتر مثبت بود. این امر به دلیل دریافت سطح انتی بادی ضد TSST-1 از مادر است. تیتر آنتی بادی بعد از سن سه سالگی، بالا رفته و تا سن شش سالگی، ۵۴/۵ ٪ کودکان دارای تیتر مثبت آنتی بادی بودند (۲۷). در مطالعات متعددی نقش توکسین‌های *استافیلوکوکی* در ایجاد بیماری‌های مختلف به ویژه در کودکان مطرح شده است. توکسین TSST-1 می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد نماید. بر پایه پژوهش‌ها، بیش از نیمی از کودکان حتی در نوزادی، دارای آنتی بادی ضد انتروتوکسین *های استافیلوکوکوس اورئوس* و به ویژه TSST-1 می‌باشند. اثر حفاظتی آنتی بادی ضد توکسین TSST-1، با افزایش سن بالا می‌رود و تا سن ۱۰ سالگی که آنتی بادی در مقادیر لازم برای مقابله با عفونت کسب می‌شود، استعداد ابتلا به عفونت ادامه دارد. ۹۵٪ بالغین تا سن ۳۰ سالگی دارای آنتی بادی می‌شوند (۲۸). در مطالعه ای که جوادی نیا و همکاران در سال ۹۲ بر روی زخم سوختگی۹۰ کودک بستری در بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران در دو گروه ۴۵ نفره تب دار دار (گروه مورد) و بدون تب (گروه کنترل) مورد بررسی قرار دادند، نشان دادند که بین دو گروه تب دار و بدون تب از لحاظ بروز توکسین TSST-1 تفاوت معنادار وجود داشت. به طوری که در گروه مورد (تب دار)، ۱۷ مورد از ۴۵ مورد (۳۷/۷۷) دارای توکسین TSST-1بودند در حالی که در گروه کنترل (بدون تب)، فقط ۵ مورد از ۴۵

مورد (۱۱/۱۱ ٪) دارای توکسین TSST-1 بودند. اما در میانگین سنی وجنس کودکان ارتباط معناداری وجود نداشت (۲۹).

گردش این ایزوله ها در اجتماع به ویژه برای افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در کشور ما جمعیت کمی را به خود اختصاص نمی دهند دارای اهمیت است. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰-۵۰ ٪ در ناحیه فارنکس و ۳۰-۵ ٪ در پوست و مو با کلونیزاسیون دائمی ۲۰-۱۰ ٪ می رسد، اهمیت بیشتری می یابد. مانیتورینگ این ایزوله ها در بیمارست می تواند در کنترل موارد خطرساز در افراد در معرض خطر مؤثر باشد. چه بسا که تا به امروز تدابیر و چاره اندیشی در این حیطه محدود به کشورهایی بوده است که در این زمینه نسبت به گزارش های گذشته و حال خود آگاهی دارند. بدین ترتیب نتایج به دست آمده از نقاط دیگر دنیا نمی تواند به طور مؤثری ما را در زمینه وضعیت سلامت و بهداشت عمومی کشورمان روشن کند و بدون شک جهت نیل به این اهداف نیاز مبرمی به مطالعات بیشتر، به خصوص در زمینه اپیدمیولوژی و شناخت سویه های غالب با تکنیک های حساس تایپینگ ژنوتیپی و فنوتیپی در کشور ما احساس می‌شود.

باتوجه به اهمیت بالینی و پتانسیل بالای سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد توکسین از نظر ایجاد بیماری های مهمی از جمله سندرم شوک سمی، شناسایی و لزوم توجه بیشتر به با به کارگیری راهکارهای مناسب درمانی و ابزارهای مناسب کنترل عفونت ضروری است. با مطالعات انجام شده مشخص گردید که روش واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص وجود توکسین سندروم شوک توکسیک در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس*روشی مناسب می باشد.

منابع

1. Stuart Walker T. 1998. Microbiology walkers. Michigan: W.B. Saunders Company..
2. Reisi M., Tajbakhsh E. and Momtaz H. 2014. Isolation and identification of antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolates from respiratory system infections in Shahrekord, Iran. Biol J Micro. 10: 97-106.
3. El-Ghodban A., Ghenghesh K.S., M.rialigeti K., Esahli H. and Tawil A.2006. PCR detection of toxic shock syndrome toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. J. Med. Microbiol .55(2):179-82.
4. Tihoo M., Mobin H., Mozafari N.A., Moadab R., Sedigh bayan K.H. and Mones rast S.H. 2011. frequently distribution toxic shock syndrome-1 (TSST-1) in S. aureus strains isolated from hospitals in Tabriz Shohada. Lab .Sci .J. 1: 39-44.
5. Nakagava S., Kushiya K., Uchiyama T. and Yamamoto T.2005. Specific inhibitory action of anisodamine against a *staphylococcal* superantigenic toxin, toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1), leading to down-regulation of cytokine production and blocking of TSST-1 toxicity in mice. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 399-408.
6. Bacha EA., Sheridan RL, Donohue GA. and Tompkins RG. 1994. *Staphylococcal* toxic shock syndrome in pediatric burn unit.Burns. 20: 499-502.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006.Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard-Ninth Edition (M2-A9).Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2006.
8. Erajian G.H., Boromand M.A., Rashedi marandi F., Rahbar M., Shahcheraghi F. and Sharifi M. 2012. Standard performance tests to determine the antimicrobial susceptibility disk diffusion method. Tehran: Voi. Pub. Cen.
9. Farahmand A, Ahmadi S, Dastmalchi Saei M, Anassori H. Identification of toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. Archives of Razi Institute .2013; 68:17-22
10. Somily AM, Babay HA. Superiority of Dzonetesting method over standard method to detectRnducible resistance in gram positive bacteria: a Prospective surveillance from a teaching hospital in Saudi Arabia. Int. J. Health .Sci. 2: 8-16.
11. Byrne-Bailey K.G., Gaze W.H., Kay P., Boxall A.B.A., HawkeyPM. and Wellington E.M.H. 2009. Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom.Antimicrob Agents Chemother. 53(2): 696-702.
12. Barber M. and Rozwadowska- Dowzenko M. 1984. Infection by penicillin- resistant Staphylococci. Lancet. 2: 6530: 641-644.
13. Kirby WM. 1994. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant Staphylococci. Science. 99 (2579): 452- 453.
14. Ramdani- Bouguessa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Reverdy ME, Lina G, et al. Detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the panton-valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50 (3): 1083- 1085.
15. Rashidiyan M, Taherpour A, Godarzi S. The frequency of nasal carriers of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical staff in Besat hospital and resistance to antibiotics of strains isolated. Kurdistan Univ Med J 2002; 6 (21): 2- 6.
16. Ghassemian R, Najafi N, Shojaeifar A. The prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriers and pattern Antibiotic resistance in the Employee Training Center – Razi GhaemShahr City in fall 2004. MazandaranUniv Med J 2004; 14 (44): 79-86.
17. Gohnson W, Tyler M, Ewan S, Ashton E, Pollard F, Rozee KR. Detection of Genes for Entrotoxins, Exfoliative Toxins and Toxin Shok Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction.J of Clinica Microbiology 1991; 29(3): 426-430.
18. Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection *Staphylococcal* ektrotoxins(SEs) N, O, P, Q, R, U and survey of SE types in

Staphylococcus aureus isolates from food-poisoning cases hn Taiwan. Int Food Micobiol 2008; 121: 66-73.
19. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of genes for *Staphylococcus aureuse*ntrotoxin, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and meticillin resistance. J Clin Microbiol 2000; 38: 1032-1038.
20. Deurenberg H, Nieuwenhuis F, Driessen C, London N, Frank R, Ellen E. The *tst* prevalence of the *Staphylococcus aureus* gene among community and hospital acquired strains and isolates from Wegener-s Granulomatosis patients. FEMS. Micobiology. Letters. 1: 185-189.
21. Islam M.J., Uddin M.S., Nasrin M.S., Nazir K.H.M., Rahman M.T. and Alam MM. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 producing coagulase positive *Staphylicoccus aureus* in human and their characterization. Bangl J Vet Med 2007; 5(1&2): 115-119.
22. Parsonnet J., Goering R., Hansmann M., Jones M., Ohtagaki K., Davis C. and Tutsuka K. 2008. Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxine-1 (TSST-1) Producing strains of *Staphylococcus aureus* and Antibody to TSST-I among Healthy Japanese Women. J. Clin. Microbiol. 48: 2731- 2738.
23. Kaufmann S.H.E. and Steward M.W. 2005.Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.10th edition, Hodder Amold Ltd, London pp.577-632.
24. Becker K Roth R. and Peters G. 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphilococcus aureus*: use of two Multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of *staphylococcal* entrotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J. Clin. Microbiol. 36: 2548-2553.
25. Bacha E.A., Sheridan R.L., Donohue G.A. and Tompkins R.G. 1994. *Staphylococcal* toxic shock syndrome in pediatric burn unit. Burns: 20: 499-502.
26. Childs C., Edwards Jones V., Heathcote D.M., Dawson M. and Davenport P.J. 1994.Patterns of *Staphylococcus aureus* colonization, toxin production, immunity and illness in burned children.Burns 20:514-521.
27. Quan L., Morita R. and Kawakami S. 2010. Toxic shock syndrome toxin. 1.Japan. child. Burns 36: 716-721.
28. White M.C., Thornton K. and Young A.E, 2005. Early diagnosis and treatment of toxic shock syndrome in paediatric burns. Burns. 20: 193-197.
29. Javadi niya S.H., Asqarian pour R., Noorbakhsh S., Soboti B., Shokrollahi M. and Tabatabaeei A. 2014. Comparison Level Toxin TSST-1 in children with fever and without fever burn wounds. Tehran. Med. Univ. J. 72 : 113-120.

Determine the antibiotic resistance patterns and tsst-1 gene frequency in *staphylococcus auresu* strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz

Ziba Shanaki Bavarsad[1], Maryam Reisi[1], Marzeyeh Soleymanian[2]
۱. MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran.
۲. phD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Iran
zibashanaki91@gmail.com ***Corresponding author:**

Abstract

Staphylococcus aureus is a major cause of hospital acquired infections and community. Toxic shock syndrome toxin -1 gene secreted by the bacteria from the categories are important virulence factors and is component super antigens toxins pyrogenic (PTSAgs). The purpose of this study is determine the antibiotic resistance patterns and tsst-1 gene frequency in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients of Imam Khomeini hospital in Ahvaz.

In this study, 133 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different samples to determine antibiotic resistance and frequency *tsst-1* gene were studied. After genomic DNA extraction using DNA extraction kit was performed the definitive diagnosis of bacteria, Then the gene *tsst-1* frequency done in the presence of specific primers and antibiotic resistance was determined by agar disk diffusion method. After PCR amplification and detection of the bacterium, Of 133 isolates sequence *tsst-1* gene was observed in 6 strains. In antibiogram test the greatest resistance to cefazolin (3/83%) and the lowest resistance to nitrofurantoin and vancomycin (0%) was observed.

Due to the increasing prevalence of resistance to antibiotics of clinical importance tsst-1 gene timely identification and implementation of appropriate therapeutic strategies for controlling infection seems necessary.

Keywords: Antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, Toxic shock syndrome toxin -1 gene